



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



# EFEITOS DA IMUNOTERAPIA INTRAVESICAL COM BACILO CALMETTE-GUERIN (BCG) EM ASSOCIAÇÃO AO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA URINÁRIA NÃO-MÚSCULO INVASIVO

**MARCO AURÉLIO DE AGUIAR E SILVA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada.

*Prof. Dr. Wagner José Fávaro*  
*Orientador*

**BOTUCATU-SP**  
**2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Júlio de Mesquita Filho"  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS DA IMUNOTERAPIA INTRAVESICAL COM BACILO  
CALMETTE-GUERIN (BCG) EM ASSOCIAÇÃO AO  
TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NO TRATAMENTO DO  
CÂNCER DE BEXIGA URINÁRIA NÃO-MÚSCULO INVASIVO

**Marco Aurélio de Aguiar e Silva**

**Orientador: Prof. Dr. Wagner José Fávaro**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,  
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do  
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Geral e Aplicada.

*Prof. Dr. Wagner José Fávaro*

*Orientador*

**BOTUCATU-SP  
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Aguiar e Silva, Marco Aurélio de.

Efeitos da imunoterapia intravesical com Bacilo Calmette-Guerin (BCG) em associação ao treinamento físico aeróbio no tratamento do câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo / Marco Aurélio de Aguiar e Silva. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Wagner José Fávaro  
Coorientador: Luis Fernando Barbisan  
Capes: 20604009

1. Bexiga - Câncer. 2. BCG. 3. Exercícios físicos.  
4. Exercícios aeróbicos.

Palavras-chave: Bexiga urinária; Câncer; Exercício físico.

## 1-RESUMO

A terapia mais eficaz para o câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo (CBNMI) é a imunoterapia com BCG (Bacilo Calmette-Guerin) associada à ressecção transuretral (RTU). Entretanto, a utilização do BCG está associada a vários efeitos colaterais de intensidades variadas, além da associação levar ao alto índice de recorrência tumoral. Além disso, não existem estudos mostrando o papel protetor do exercício físico aeróbio (EFA), como terapia adjuvante, sobre a evolução da carcinogênese urotelial. Assim, o presente estudo objetivou caracterizar e comparar as alterações morfológicas e moleculares da imunoterapia intravesical com BCG associada com o EFA na evolução do CBNMI induzido em ratos, enfocando os receptores do sistema imune inato, angiogênese e balanço oxidativo. Para a indução do CBNMI, vinte fêmeas da linhagem Fischer 344 receberam uma dose intravesical de 1,5 mg/Kg de *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU) a cada 15 dias, totalizando 4 aplicações. Cinco fêmeas que não receberam MNU foram consideradas como Grupo Controle (Grupo 1) e receberam uma dose semanal intravesical de 0,3 mL de NaCl 0,9% por 6 semanas consecutivas. Duas semanas após a última aplicação da MNU, os animais foram divididos em quatro grupos (n=5 cada): Grupo MNU (Grupo 2): recebeu NaCl 0,9% por seis semanas consecutivas como o Grupo 1; Grupo MNU+BCG (Grupo 3): recebeu uma dose semanal intravesical de 2mg/mL de BCG por 6 semanas consecutivas; Grupo MNU+EFA (Grupo 4): recebeu o mesmo tratamento que os Grupos 1 e 2, e simultaneamente submetido ao protocolo de EFA (natação), ambos por 6 semanas consecutivas; e Grupo MNU+EFA+BCG (Grupo 5): recebeu uma dose semanal intravesical de BCG como descrito no Grupo 3 e simultaneamente submetido ao protocolo de EFA (natação), ambos por 6 semanas consecutivas. Após o tratamento, as bexigas urinárias foram coletadas e submetidas às análises histopatológicas e moleculares das proteínas TLR2,TLR4, NF-KB, IL-6, MMP-2, AKT, VEGF, Endostatina, NOX1, Nrf2, Bcl-2, BAX, B-actina . Os resultados demonstraram que os animais do Grupo 2

(MNU) apresentaram redução significativa no peso corporal e lesões uroteliais mais agressivas quando comparado aos demais grupos experimentais. No grupo com BCG e na associação entre BCG e EFA não foram observadas lesões uroteliais invasivas e, em geral de menor agressividade. Os níveis proteicos dos receptores *toll-like* (TLRs) 2 e 4, NFK-B e IL-6 foram significativamente maiores nos grupos G3 (MNU+BCG) e G5 (MNU+BCG+EFA). Uma redução significativa de VEGF associada a um aumento significativo de endostatina foram observados, em especial no grupo da associação BCG e EFA. Em contraste, os níveis protéicos de NOX1 foram reduzidos e os níveis protéicos de Nfr2 foram significativamente aumentados no grupo submetido à associação entre BCG+EFA. Portanto, a redução do grau de agressividade tumoral pela associação BCG e EFA foi provavelmente decorrente da diminuição dos TLR 2 e 4, estresse oxidativo, angiogênese e potencial aumento de apoptose na bexiga urinária de animais iniciados com a MNU. Assim, o exercício físico aeróbio poderia aumentar a eficácia do BCG no tratamento do CBNMI.

## **ABSTRACT**

An effective therapy for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer (NMIBC) is the immunotherapy with BCG (Bacille Calmette-Guerin) associated with transurethral resection (TR). However, the use of BCG is associated with various adverse effects of different intensities, besides this association lead to higher tumor recurrence rate. Moreover, there are no studies showing the protective role of aerobic exercise (AE) as an adjunct therapy against the development of urothelial carcinogenesis. Thus, this study aimed to characterize and compare the morphological and molecular changes of intravesical BCG immunotherapy associated with the AE in the evolution of NMIBC chemically-induced in rats focusing on the receptors of the innate immune system, angiogenesis and oxidative balance. For inducing of BCNIM, twenty-five females Fischer 344 strain received an intravesical dose of 1.5 mg/kg of N-methyl-N-Nitrosourea (MNU) every fifteen days, a total of four applications. Five females who have not received MNU were considered as control group (Group 1) and received weekly an intravesical administration of 0.3 ml of 0.9% NaCl for six consecutive weeks. Two weeks after the last dose of MNU, the animals were divided into four groups (5 animals per group): Group MNU (Group 2) - received 0.9% NaCl for six consecutive weeks as group 1; Group MNU+BCG (Group 3) - received weekly a intravesical administration of 2 mg/ml of BCG for six consecutive weeks; Group MNU+AE (Group 4) - received the same treatment as Group 1 and 2, and simultaneously were subjected to aerobic exercise protocol (swimming), either for six consecutive weeks; and Group MNU+AE+BCG (Group 5) - received weekly an intravesical dose of BCG as described in Group 3 and simultaneously submitted to the AE protocol (swimming), both for six consecutive weeks. After treatments, urinary bladders were collected and subjected to histological and molecular analysis. The results showed that Group 2 (MNU) presented a significant reduction in body weight and more aggressive urothelial

lesions when compared to the other experimental groups. In the group with BCG and the association between BCG and AE were not observed invasive urothelial lesions and its generally showed lower aggressive phenotype. The protein levels of the toll-like receptors (TLRs) 2 and 4, NF-KB and IL-6 were significantly higher in groups 3 (MNU+BCG) and 5 (MNU+BCG+AE). A significant reduction in VEGF protein associated with a significant increase of endostatin levels were observed in groups 3 (MNU+BCG) and 5 (MNU+BCG+AE) but particularly in the group 5 (MNU+BCG+AE). In contrast, a reduction in NOX 1 protein level, but an increase in Nfr2 protein level were detected in the group submitted to the association between BCG and AE treatments. Therefore, lower tumor aggressiveness for the association between BCG and AE was probably due to the decrease of the toll-like receptors 2 and 4, oxidative stress, angiogenesis and potential increase in apoptosis in the bladder urothelium of animals initiated by MNU. Thereby, aerobic exercise could increase the effectiveness of BCG in the treatment of NMIBC.

## ÍNDICE

<b>1-RESUMO</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>DEDICATÓRIA</b> .....	9
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	11
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	13
<b>2- INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>3-REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
3.1- Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo (CBNMI) .....	16
3.2.Cancer de Bexiga em mulheres .....	18
3.4-Via de Sinalização dos Receptores <i>Toll Like</i> (TLR).....	22
3.5-.Imunoterapia Intravesical com BCG no CBNMI .....	26
3.6- Perspectivas Terapêuticas para o CBNMI: Exercício Físico .....	27
<b>4-JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	33
4.1- Justificativa .....	33
4.2 Objetivos .....	34
4.2.1 Objetivos específicos.....	34
<b>5.MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
<b>6. RESULTADOS</b> .....	42
6.1. Modalidades Terapêuticas Baseadas na Imunoterapia Intravesical com BCG e Exercício Físico Aeróbico (EFA) Restauram o Peso Corporal.....	42
6.2.Imunoterapia Intravesical com BCG Associada ao Exercício Físico Aeróbico (EFA) Reduzem a Agressividade Tumoral .....	43
6.3. Associação entre Imunoterapia Intravesical com BCG e Exercício Físico Aeróbico (EFA) Estimulam o Sistema Imune Inato e Induzem o Aumento de Citocinas Inflamatórias .....	49
6.4. Imunoterapia Intravesical com BCG Associada ao Exercício Físico Aeróbico (EFA) Suprimem a Angiogênese.....	50
6.5. Associação entre Imunoterapia Intravesical com BCG e Exercício Físico Aeróbico (EFA) Reduzem os Níveis Proteicos dos Fatores Indutores de Lesão (AKT e MMP-2), Culminando com Aumento da Apoptose (BAX) e Diminuição da Proliferação Celular (Bcl-2).....	51
6.6. Imunoterapia Intravesical com BCG Associada ao Exercício Físico Aeróbico Alteram o Balanço Oxidativo, Reduzindo os Níveis Proteicos de NOX1 e Aumentando os de Nrf2..	52
<b>7- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES</b> .....	56
<b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>



# *Dedicatória*

Ao meu pai, Paulo Roberto, com carinho em meu coração, a minha mãe, Ivonete, que esta ao meu lado em todos os momentos e meus irmãos, Marcelo, Murilo e Mauricio, pelos ensinamentos diários feitos através de um singelo abraço, um choro, um afago ou uma ação realizada silenciosamente. A Minha Noiva Dayse por todos os momentos de alegrias e outros de estresse, mas sempre ao meu lado dando seu apoio e carinho, no mestrado e agora no doutorado.

A todos o meu amor eterno e meu muito obrigado.

# *AGRADECIMENTOS*

- Agradeço Deus por tudo o que Ele me proporciona;
- A minha família, o centro de toda a minha formação;
- Os membros da banca examinadora, pelas valiosas análises e sugestões feitas ao trabalho;
- Os membros da banca de qualificação, pelas preciosas dicas dadas;
- Agradeço a minha amiga e mentora prof. Dr<sup>a</sup> Kelly Silva Furtado, por todos os ensinamentos transmitidos e pelas horas de estudo;
- Agradeço ao José Eduardo Bozano e Ricardo Teixeira, técnicos do Departamento de Morfologia UNESP\BOTUCATU, por todos os trabalhos realizados e prestados para que o resultado fosse esta tese.
- Agradeço ao Walter Ferreira, Norival, Paulo Francisco e Paulo Taxidermia, técnicos do Departamento de Anatomia UNICAMP\CAMPINAS, por todos os trabalhos realizados e prestados para que o resultado fosse esta tese.
- Gostaria de agradecer a camaradagem dos meus colegas do departamento de Anatomia e os amigos da UNICAMP/Campinas. Não citarei nomes, pois com certeza não colocarei muitos, por um lapso de memória. Mas saibam que todos estarão comigo (presentes ou no meu pensamento) para sempre;
- Agradeço o Dr Fabio, meu dentista por me aliviar das dores de cabeça que na verdade vieram em forma de bruxismo, oriundo do doutoramento;
- Por fim, agradeço aos ensinamentos dados por todos os professores que eu tive, durante os meus estudos;
- Que me perdoem as pessoas que eu não citei, mas mereciam estar aqui. Com certeza esses nomes estarão para sempre comigo, em meu sentimento de gratidão, carinho e companheirismo.

Agradeço a CAPES pelo apoio em forma de bolsa, e financiamento, que foi a mim concedida durante o período de doutoramento.

Agradeço ao Prof. Dr. José Wagner Fávaro (Orientador), ao Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan (Co-orientador) e o Prof. Dr. Marcos Fontes (Coordenador da PG em BGA) por viabilizar a finalização desta pesquisa e Defesa de Tese.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AKT</b>	Família de proteínas quinases são quinases serina/treonina	<b>MAPKs</b>	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato	<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>BAX</b>	Família de genes dos mamíferos podem ser pró ou anti apoptóticos	<b>MMP</b>	Metaloproteinase de matriz
<b>BCG</b>	Bacillus Calmette – Guerin	<b>MMP-2</b>	Metaloproteinase 2
<b>Bcl2</b>	<i>B – cell – lymphoma – 2</i>	<b>MMPs</b>	Metaloproteinases de matriz
<b>BSA</b>	Soro de Albumina Bovina	<b>MNU</b>	N-metil-N-nitrosureia
<b>CB</b>	Câncer de bexiga	<b>MyD88</b>	Fator 88 de diferenciação mielóide
<b>CBNMI</b>	Câncer de bexiga não-músculo invasivo	<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>CBU</b>	Câncer de bexiga urinária	<b>NF-kB</b>	Fator de transcrição nuclear
<b>CEMIB</b>	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica	<b>NK</b>	Natural Killer
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais	<b>Nox-1</b>	NADPH-oxidase é um enzima que, em seres humanos é codificada pelo Nox1
<b>CFU-GM</b>	Colônia de granulócitos/macrófagos	<b>NRF-2</b>	Fator nuclear-E2 de transcrição
<b>EDTA</b>	Ácido Tetra-acético-etileno-diamino	<b>PAMPs</b>	Pathogen-associated molecular patterns
<b>EFA</b>	Exercício Físico Aeróbio	<b>PT1</b>	tumor confinado à mucosa e submucosa da bexiga;
<b>EGFR</b>	Fator de crescimento epidermal	<b>PTa</b>	tumor papilífero
<b>ERKs</b>	Proteínas quinases reguladoras de sinalização extracelular	<b>PTis</b>	carcinoma in situ;
<b>EROS</b>	Espécies Reativas de Oxigênio	<b>RTU</b>	Ressecção transuretral
<b>FGF</b>	Fator de crescimento fibroblástico	<b>TLRs</b>	Receptores de toll-like
<b>HE</b>	Hematoxilina-eosina	<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>HIF</b>	Fator transcricional indutor de hipóxia	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
<b>IL</b>	Interleucinas	<b>TRAM</b>	Molécula adaptadora relacionada ao TRIF
<b>iNOS</b>	Óxido Nítrico Sintase Indutível	<b>TRIF</b>	Adaptador contendo o domínio TIR induzindo Interferon B
<b>JNKs</b>	Proteínas quinases c-jun-N-terminal	<b>Tris-HCl</b>	(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride
		<b>VEGF</b>	Fator de crescimento vascular endotelial

## 2- INTRODUÇÃO

O câncer de bexiga urinária (CB) é a segunda doença maligna mais comum do sistema urinário (Howlander et Al., 2013; American Cancer Society, 2013, 2015). Vários fatores de risco tem sido relacionados ao desenvolvimento de CB, como a exposição a agentes cancerígenos químicos e ao tabaco do cigarro. O tabagismo é um dos maiores fatores de risco, na sua composição existem vários produtos carcinogênicos, o qual é responsável por um terço dos casos de CB. Apesar do CB acometer mais homens do que as mulheres, a severidade deste tipo de neoplasia é mais evidente no sexo feminino (Shariat et al., 2010; Fajkovic et al., 2011; Messer et al., 2014; Wolff et al 2015).

Atualmente, a terapia mais eficaz para o tratamento do câncer de bexiga não musculo invasivo- CBNMI é a imunoterapia com bacilo Calmette-Guerin, mas esta terapia associa-se a vários efeitos colaterais em cerca de 90% dos casos (Askeland et al., 2012). A incidência de efeitos adversos locais e sistêmicos é significativamente reduzida com a utilização de agentes quimioterápicos. No entanto, a resposta à quimioterapia intravesical é incompleta e a recorrência tumoral é elevada (superior a 80%) em pacientes com o câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo (CBNMI) (Kemp et al., 2005; Reis et al 2009; Askeland et al., 2012).

O tratamento do CB com Bacilo Calmette-Guerin (BCG) tem efeito comprovado na redução de recidiva e progressão tumoral, embora ocorram efeitos colaterais de intensidades variadas, desde sintomas irritativos leves até reação sistêmica grave (Andreas & Brandau, 2003; Hall et al., 2007; Askeland et al., 2012). Evidências sugerem que os fatores ambientais, estilo de vida e principalmente o exercício físico podem melhorar a qualidade de vida dos pacientes com câncer e/ou retardar o desenvolvimento tumoral (Bergasa, 2004; Kalter et al 2016; Aguiar e Silva et al 2012). Desta forma, o desenvolvimento de novas terapias ou associações de terapias antitumorais para o tratamento do CBNMI, que sejam mais eficazes e apresentem menores efeitos adversos que as terapias clássicas, são relevantes. Em face do

papel estratégico do exercício físico e da necessidade de estudos específicos na área da carcinogênese urotelial, destaca-se o exercício físico aeróbio, o qual abre nova perspectiva no combate de alguns cânceres, incluindo o urotelial (Gopalakrishna et al 2016).

Em muitos cânceres, a natureza das espécies reativas de oxigênio (EROs) que amplifica a lesão primária não é conhecida (Ushio-Fukai & Nakamura, 2008; Badjatia et al., 2010). Desta forma, torna-se difícil o planejamento correto da utilização de fármacos e/ou medidas não farmacológicas, como o exercício físico, com propriedades antioxidantes que eliminem diretamente as EROs, impedindo sua reação com alvos celulares e assim, evitando a progressão das lesões tumorais induzidas por esses radicais livres (Brum et al., 2004; Kuo et al., 2007; Packer et al., 2007). Assim, o conhecimento da interação da imunoterapia vesical com BCG com o exercício físico aeróbio, bem como a interação dessas medidas terapêuticas com as enzimas antioxidantes é fundamental para o entendimento da evolução da carcinogênese urotelial.

A investigação de alterações histológicas e moleculares que possam ser atenuadas na carcinogênese da bexiga urinária pelo efeito do exercício físico fornecerá elementos para sua indicação na prevenção e no tratamento dessa doença. Ainda, cabe ressaltar que não há trabalhos científicos relacionando os efeitos da imunoterapia com BCG e exercício físico aeróbio no CB, bem como suas relações com moléculas indutoras e reparadoras de lesão celular, angiogênese, estresse oxidativo e enzimas antioxidantes.

### 3-REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1- Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo (CBNMI)

O câncer de bexiga urinária (CB) é a segunda doença maligna mais comum do sistema urinário (American Cancer Society, 2015). A Sociedade Americana do Câncer estimou cerca de 74 mil novos casos de CB diagnosticados e 16 mil mortes causadas pelo CB nos Estados Unidos em 2015 (American Cancer Society, 2015). Entretanto, no Brasil, a estimativa, segundo o INCA para 2014 era de 8940 novos casos de CB (Instituto Nacional de Câncer, 2014). Mais de 70% da incidência de CB é de lesões superficiais, tumor não-invasivo (CBNMI) e a ocorrência de lesões invasivas é ocasional (Kroft & Oyasu, 1994; Montironi & Lopez-Beltran, 2005; Reis et al., 2009; Zhang et al., 2011; Askeland et al., 2012). Os tumores superficiais são classificados em três estágios: Tis - carcinoma *in situ*; Ta - papilífero e T1 - tumor confinado à mucosa e submucosa da bexiga, ocorrendo em 10%, 70% e 20%, respectivamente (Ro et al., 1992; Epstein et al., 1998). Contudo, 50% dos tumores não-músculo invasivos recorrem em 4 anos após o tratamento e 11% evoluem para o fenótipo invasivo (Zhang et al., 2011; Askeland et al., 2012). A idade média ao diagnóstico é de 65 a 70 anos e o pico de incidência ocorre aos 65 anos (Kirkali et al., 2005; Schutzzel et al., 2008). Com uma alta taxa de incidência, recorrência e progressão do CB, os gastos no tratamento dessa doença são bastante elevados. Dependendo do país o tratamento e acompanhamento do CB pode variar o custo entre 90 e 200 mil dólares por paciente, entre a fase de diagnóstico até o óbito (Botteman et al., 2003; Sievert et al., 2009). Por ser uma doença mais frequente em idosos e, com o aumento da expectativa de vida da população, a incidência da doença tende a ser maior e, esses gastos, muito mais preocupantes para a saúde pública.

Um número significativo de fatores de risco tem sido relacionado ao desenvolvimento de CB, como a exposição a agentes cancerígenos químicos. Ainda pesquisadores não conseguem elucidar cientificamente os mecanismos que fazem com que o CBNMI acometa



mais homens do que as mulheres, mas com maior severidade nas mulheres (Fajkovic et al., 2011). Supostamente tem uma relação não só hormonal e anatômica, mas com o estilo de vida e diagnóstico mais tardio em mulheres do que em homens (Parkin et al., 2008; Shariat et al., 2010; Messer et al., 2014). O tabagismo é um dos maiores fatores de risco, o qual é responsável por um terço dos casos de CB (Zeegers et al., 2000). A fumaça do cigarro de tabaco contém cerca de 4.700 substâncias químicas, muitas das quais são compostos genotóxicos, tais como os compostos *N-nitroso* e aminas aromáticas (Grimmer et al., 2000). A urina dos fumantes tem mostrado características mutagênicas, contendo o dobro da concentração total de aminas aromáticas quando comparada com os compostos encontrados na urina de não-fumantes (Grimmer et al., 2000).

Alterações neoplásicas podem ser iniciadas na bexiga urinária de camundongos e ratos no período de algumas semanas de tratamento com doses baixas de carcinógenos químicos que são instilados diretamente na bexiga dos animais (Crallan et al., 2006; Reis et al., 2009). Em 1972, Hicks & Wakefield utilizaram quatro doses de N-metil-N-nitrosouréia (MNU) para rápida indução do CBNMI em ratos, demonstrando que este é um carcinógeno completo. O MNU pode atuar como iniciador e promotor da neoplasia podendo causar adutos de DNA e alterações epigenéticas no DNA (Steinberg et al., 1990). Além disso, o MNU é o único carcinógeno conhecido por agir diretamente sobre o urotélio, sem a necessidade de ativação metabólica (Steinberg et al., 1990). Posteriormente, este modelo foi modificado e reproduziu tumores de bexiga que são morfologicamente semelhantes aos observados em humanos, os quais tiveram origem exclusiva no urotélio e histologicamente equivalem ao carcinoma de células transicionais em humanos, sendo portanto, um importante modelo para o estudo do CBNMI (Perabo et al., 2005; Reis et al., 2009).

O estudo do CBNMI tem sido amplamente abordado, utilizando-se diversos modelos experimentais; os modelos de indução química em roedores para carcinogênese de bexiga

apresentam características semelhantes ao CBNMI desenvolvido em humanos (Cohen, 2002; Reis et al., 2009). A estrutura e função do sistema urinário inferior de roedores são semelhantes as dos seres humanos e ambas as espécies exibem perfis de expressão gênica similares no CBNMI, sugerindo que os roedores servem como modelo experimental para o CB (Williams et al., 2008).

A carcinogênese urotelial em roedores sofre uma sequência de alterações morfológicas, iniciando com hiperplasia simples seguida de hiperplasia nodular e papilar progredindo, posteriormente, para papiloma, ocasionalmente, carcinomas não-invasivos e, finalmente, a neoplasias invasivas (Oyasu, 1995; Cohen, 2002; Oliveira et al., 2006). Muitos tumores exofíticos induzidos quimicamente em ratos são geralmente pedunculados e com um padrão de crescimento rápido (Oyasu, 1995; Cohen, 2002). A hiperplasia nodular em camundongos é consideravelmente mais comum do que as proliferações papilíferas, ocorrendo com certa frequência na ausência completa de hiperplasia papilar (Fukushima et al., 1981;Cohen, 2002).

### **3.2.Cancer de Bexiga em mulheres**

Especificamente nas mulheres, estudos epidemiológicos/clínicos mostram que os prognósticos para o CBNMI, não só podem ser preditos por variáveis biológicas tais como predisposição genética ou diferenças anatômicas e endócrinas, mas alguns estudos mostram que aspectos comportamentais divergentes existem, por exemplo, diferentes fatores de estilo de vida, avaliação medica tardia para diagnóstico e tratamento (Shariat et al., 2010; Messer et al., 2014; Wolff et al 2015). Os sintomas iniciais e o grau da neoplasia são iguais para ambos os sexo (Henning et al., 2013), mas em seu estudo Johnson et al. (2008) relatam que após apresentarem hematúria a avaliação de um urologista para um diagnostico de neoplasia é mais tardia no sexo feminino, levando a detecção de lesões mais avançadas.

As diferenças na incidência e variações do prognóstico entre os sexos podem ser explicadas em uma base molecular, pois o CB apresenta uma severidade que esta associada com hormônios específicos, os andrógenos e estrógenos (Gakis & Stenzl., 2013; Xu et al; 2013). Os andrógenos em especial, pelas suas vias de sinalização, não pode estar associado à progressão da neoplasia. (Tuygun et al; 2011; Gakis & Stenzl., 2013;).

### **3.3-Balanco Oxidativo e Regulação da Angiogênese**

A incidência aumentada de doenças crônico-degenerativas associadas á formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) vem merecendo especial atenção. (Ichimura et al., 2004; Bayraktar et al., 2010). EROs e outros radicais livres (RLs) são moléculas altamente instáveis e reativas que possuem um elétron não-pareado no orbital mais externo (Elsbach & Weiss, 1983). Essa configuração eletroquímica permite a interação com macromoléculas biológicas podendo causar alterações nos componentes celulares: proteína, DNA e lipídio (Brown-Borg et al., 1999). EROs são consideradas carcinógenos efetivos podendo participar da iniciação, promoção/progressão e metástase das neoplasias (Eblin et al., 2008). Concentrações elevadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são produzidas e excretadas pelas células tumorais, confirmando sua importância na aquisição de fenótipos de propagação e invasão tumorais.

As enzimas NADPH oxidases (NOX) são as principais geradoras de EROs celular (Segal & Shatwell, 1997; Shimada et al., 2011). A redução do oxigênio molecular dependente da NOX é responsável por gerar EROs na célula, na forma de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, o qual é dismutado para formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Khandrika et al., 2009; Shimada et al., 2011). Estudos demonstraram que baixos níveis de EROs geradas por NOX podem atuar como mediadores da inflamação, apoptose, proliferação celular e angiogênese em vários cânceres humanos (Shimada et al., 2011). Recentemente, Shimada et al. (2009) identificaram que a geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por NOX1 aumentou a resistência à apoptose de células uroteliais tumorais humanas tanto *in vitro* quanto

*in vivo*, e concluíram que a geração de EROs através de NOX1 desempenhou papel importante na progressão do CB, mas não nas etapas iniciais da carcinogênese ou sobrevivência da célula tumoral urotelial.

O organismo humano possui um sistema de defesa intrínseco contra a ação dos EROs. O fator de transcrição eritróide 2p45 (NF-E2), relacionado ao fator 2 (Nrf2), medeia a expressão de enzimas de proteção através do elemento de resposta antioxidante (ARE) em diferentes tipos de cânceres (Slocum & Kensler, 2011). Iida et al. (2004) demonstraram que o Nrf2 desempenha papel importante na detoxificação de agentes cancerígenos derivados metabolicamente a partir de um composto *N-nitroso*, os quais são encontrados no cigarro de tabaco e apontado como um fator relevante na gênese do CBNMI.

As EROs são o resultado do desequilíbrio entre a formação e a remoção dos EROs no organismo, condição na qual ocorre aumento da concentração de espécies pró-oxidantes e redução nas defesas antioxidantes (Brown-Borg et al., 1999; Badjatia et al., 2010; Bayraktar et al., 2010). EROs podem afetar várias funções nas células cancerosas ou tecidos tumorais, tais como proliferação celular, promoção de mutações e instabilidade genética, alterações na sensibilidade celular a agentes anticancerígenos, invasão e metástase (Kong et al., 2000; Brown & Bicknell, 2001). EROs aumentam nas células tumorais a produção de fatores angiogênicos, como a interleucina 8 (IL-8) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), e a secreção de metaloproteinase da matriz 2 (MMP-2), uma gelatinase que auxilia na invasão tumoral e angiogênese no interior do microambiente tumoral (Brown & Bicknell, 2001).

A MMP-2 é sintetizada por células do tecido conjuntivo, principalmente fibroblastos, condrócitos e células da membrana sinovial e, apresentam papel essencial no remodelamento da MEC (Mizui et al., 2001; Yoshida et al., 2006). As MMPs também podem direta ou indiretamente afetar a atividade de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Ao

mesmo tempo, essas citocinas estimulam a síntese, liberação e ativação de MMPs, potencializando, assim, a resposta inflamatória (PARKS et al., 2004).

As EROs podem, portanto, ativar a levar a angiogênese tumoral (Brown & Bicknell, 2001; Ushio-Fukai & Nakamura, 2008; Badjatia et al., 2010). A angiogênese é definida como o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes dependentes da proliferação e migração das células endoteliais, sendo assim, possui um papel importante no crescimento e desenvolvimento dos tecidos, cicatrização de feridas e na tumorigênese (Shibuya & Claesson-Welsh, 2006). O processo de angiogênese é essencial para a sobrevivência, proliferação e potencial metastático de tumores malignos (Folkman, 2006). O microambiente tumoral é caracterizado por uma flutuação de hipóxia concomitante a uma privação de nutrientes o que desencadeia o aumento das adaptações de clones de células tumorais (com assinaturas genéticas e epigenéticas específicas), bem como o aumento da invasividade e metástase (Semenza, 2003; Kimbro e Simons, 2006). Por sua vez, essas adaptações hipóxicas conferem aos tumores maior resistência às terapias atuais (Semenza, 2003; Kimbro e Simons, 2006). Parte desta adaptação está relacionada com a regulação de genes de resposta a hipóxia. Relata-se que no câncer renal o fator transcricional indutor da hipóxia (HIF) aparece aumentado e induz a transcrição de genes envolvidos na angiogênese, além dos genes envolvidos no metabolismo da glicose, da adesão celular, da migração celular, da proteólise, regulação do pH e proliferação celular (Charlesworth et al., 2006; Harris, 2002; Semenza, 2003; Taylor and Pouyssegur, 2007).

Em condições normais, as células endoteliais estão quiescentes e controladas por uma rede de fatores pró e antiangiogênicos (Charlesworth et al., 2006). Entretanto, esta regulação pode sofrer alterações decorrentes de algum tipo de estresse metabólico (hipóxia, acidose, hipoglicemia), força mecânica (crescimento celular) e ativação do sistema imune, desencadeando a formação de novos vasos (Streeter, 2002). Experimentos indicam que a

urina de pacientes com câncer urotelial contém um aumento de moléculas pró-angiogênicas (Chodak et al., 1988; Nguyen et al., 1994) como, por exemplo, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que se liga com seus receptores nas células endoteliais e estimula a proliferação, migração e permeabilidade endotelial (Fong et al., 1995).

A angiogênese é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento da maioria dos tipos de cânceres, pois na ausência da vascularização os tumores sólidos crescem apenas 1 a 2 mm (Abdollahi et al., 2003; Folkman, 2006). Assim, os inibidores da angiogênese têm sido desenvolvidos para atingir as células endoteliais vasculares e bloquear a formação de novos vasos para impossibilitar a progressão do tumor, uma vez que essas células são geneticamente estáveis e, portanto, menos propensas a acumular mutações que lhes permitiria desenvolver resistência a fármacos (Abdollahi et al., 2003; Folkman, 2006).

Os inibidores da angiogênese são divididos em inibidores diretos e indiretos, sendo que os diretos atuam nas células endoteliais impedindo-as de responder aos estímulos pró-angiogênicos, enquanto os inibidores indiretos interferem na comunicação pró-angiogênica entre as células tumorais e as células endoteliais (Folkman & Hlatky, 1998). O efeito indireto pode ser alcançado por inibição da expressão do VEGF no tumor ou bloqueio da expressão e/ou da ativação dos receptores dos fatores pró-angiogênicos nas células endoteliais, por exemplo, bloqueando o receptor do VEGF (Folkman & Hlatky, 1998). A endostatina é um inibidor direto da angiogênese, que exerce seus efeitos através da inibição da vascularização e do suprimento sanguíneo nos tecidos neoplásicos, além do fato de que induz a apoptose tanto nas células endoteliais vasculares quanto nas tumorais (O'Reilly et al. 1997; Schmidt et al., 2004), sendo, portanto, uma potente substância antitumoral.

### **3.4-Via de Sinalização dos Receptores *Toll Like* (TLR)**

Os receptores de *toll-like* (TLRs) pertencem a uma família de receptores transmembrana que reconhecem padrões moleculares conservados de origem microbiana que são conhecidos por padrões moleculares associados à patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*; PAMPs) (Srikrishna & Freeze, 2009; Galli et al., 2010; Kumar et al., 2011). Também, os TLRs têm papel fundamental na reparação tecidual e lesão tecidual induzida por inflamação (Akira & Takeda, 2004; Galli et al., 2010). Neste contexto, os ligantes de TLRs podem ser derivados microbianos ou hospedeiros endógenos (Takeda et al., 2003; Galli et al., 2010). TLRs que reconhecem lipídios e proteínas ligantes (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) estão expressos na membrana plasmática, enquanto TLRs que detectam ácidos nucleicos virais (TLR3, TLR7 e TLR9) estão localizados em compartimentos lisossomais (Takeda et al., 2003; Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004; Galli et al., 2010).

A sinalização dos TLRs induz a ativação dos genes de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-12, bem como a expressão de moléculas co-estimulatórias em células dendríticas e macrófagos. Coletivamente, cada TLR recruta uma combinação específica de moléculas adaptadoras para ativar diferentes fatores de transcrição que darão origem à resposta apropriada e efetiva contra o patógeno estimulador (Akira & Takeda, 2004; Galli et al., 2010). A transdução de sinais dos TLRs ocorre através de diferentes proteínas adaptadoras, as quais desencadeiam uma cascata de sinalização envolvendo o fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), proteínas-quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), p38, proteínas quinases c-jun-N-terminal (JNKs), proteínas quinases reguladoras de sinalização extracelular (ERKs) e os fatores regulatórios de interferon (IRF3, IRF5 e IRF7) (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004). Muitos dos efeitos conhecidos da sinalização dos TLRs ocorrem através da translocação do NF- $\kappa$ B e subsequente produção de moléculas inflamatórias e moléculas para sobrevivência celular, como TNF- $\alpha$  e interleucinas 1 e 6 (IL-1

e IL-6) (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004; Galli et al., 2010). A função clássica dos TLRs consiste no recrutamento de leucócitos para os tecidos infectados com posterior indução de respostas imunes adaptativas (Akira & Takeda, 2004; Galli et al., 2010). A ativação de TLRs na superfície das células epiteliais induz a expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM), as quais desempenham um papel fundamental na implantação e adesão de leucócitos (Galli et al., 2010).

O reconhecimento dos PAMPs pelos TLRs estimula o recrutamento de proteínas adaptadoras que possuem domínios TIR em sua estrutura para interagir com o domínio TIR intracelular dos TLRs (Takeda & Akira, 2004). As moléculas adaptadoras envolvidas na sinalização dos receptores TLRs são: fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88), TIRAP, TRIF e TRAM (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004). A proteína MyD88 é utilizada por todos os TLRs, a exceção do TLR3, e ativa NF- $\kappa$ B e as vias das MAPKs para induzir a produção de citocinas inflamatórias (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004). TLR3 utiliza a molécula adaptadora TRIF para sinalizar a produção de interferon e citocinas inflamatórias via ativação dos fatores de transcrição, IRF3 e NF- $\kappa$ B, respectivamente (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004). TRAM e TIRAP são moléculas adaptadoras utilizadas pelo TLR4 para recrutar TRIF e pelo TLRs 2 e 4 para recrutar MyD88, respectivamente (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004). Assim, a sinalização dos TLRs pode ser classificada de duas formas: via dependente de MyD88 (via canônica) para a produção de citocinas inflamatórias e via dependente de TRIF (via não-canônica) para a produção de interferon (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004). TLR4 é o único receptor que utiliza as quatro moléculas adaptadoras (MyD88, TRIF, TIRAP e TRAM) para desencadear sua sinalização (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004).

Os TLRs foram, inicialmente, identificados somente em células imunes e epiteliais, contudo estudos recentes demonstraram que estes receptores também são expressos em



algumas células tumorais, sendo que essa expressão está relacionada à carcinogênese (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2009; Galli et al., 2010). O papel dos TLRs no câncer é uma questão controversa, pois dados conflitantes apontam os TLRs como reguladores negativos ou positivos da carcinogênese. A administração de agonistas dos TLRs exerceu fortes efeitos anti-neoplásicos contra tumores desenvolvidos em camundongos humanos (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2009). A ativação dos TLR pode causar a regressão do tumor através do aumento da permeabilidade vascular e por meio do recrutamento de leucócitos, os quais determinam a lise das células tumorais pelas células *natural killer* (NK) e células T citotóxicas (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2009). Assim, um dos efeitos mais promissores da estimulação dos TLRs por agonistas específicos na terapia do câncer é a ativação do sistema imune adaptativo (Krieg, 2007; Paone et al., 2008; Galli et al., 2010).

Evidências contraditórias apontam que, sob certas condições, a inflamação promove carcinogênese, enquanto em outras, ela exerce efeitos antitumorais. Este fato pode ser explicado pela diferença de intensidade e da natureza da resposta inflamatória (Mantovani et al., 2008; Galli et al., 2010). Na maioria dos casos, a inflamação associada ao câncer é semelhante à inflamação crônica, incluindo a produção de fatores que estimulam o reparo tecidual e a proliferação e sobrevivência da célula cancerosa (Mantovani et al., 2008; Galli et al., 2010). No entanto, se a resposta inflamatória se desenvolve em inflamação aguda, um mecanismo efetor imunológico é ativado com consequente regressão do tumor (Mantovani et al., 2008; Galli et al., 2010). Considerando os diversos elementos que controlam os processos neoplásicos, um importante papel é atribuído aos membros da superfamília de quimiocinas (Bem-Baruch, 2006). Quimiocinas expressas pelas células tumorais e células do hospedeiro desempenham um papel crítico no desenvolvimento do tumor através da regulação da migração de diferentes subtipos de leucócitos (Bem-Baruch, 2006). A proporção relativa de cada tipo de célula de defesa no interior do tumor, por exemplo, macrófagos, células T,

células NK, células dendríticas, ou outros subtipos de leucócito, determina em grande parte o perfil imunológico local (Allavena et al., 2008). Em particular, células T CD8 e alguns tipos de células do sistema imunológico inato, como as células NK, podem inibir o crescimento tumoral (Allavena et al., 2008; Mantovani et al., 2008; Galli et al., 2010).

### **3.5-Imunoterapia Intravesical com BCG no CBNMI**

O tratamento primário do CBNMI baseia-se na utilização de técnica cirúrgica por meio da ressecção transuretral (RTU), seguida de imunoterapia intravesical com *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), a fim de diminuir recidiva e prevenir a progressão tumoral. Entretanto, o câncer vesical, é caracterizado por lesões superficiais (CBNMI) e apresenta elevada taxa de recidiva e progressão após ressecção endoscópica (Askeland et al., 2012). Contudo, 20% - 30% desses tumores apresentam progressão e 70% recorrência pós-tratamento exclusivo com RTU (Kemp et al., 2005; Askeland et al., 2012). Por outro lado, sabe-se que a terapia adjuvante com BCG diminuiu esses índices para 30% (Hall et al., 2007; Askeland et al., 2012). Morales et al. (1976) foram pioneiros em comprovar o sucesso no tratamento do CBNMI com BCG. Desde então, BCG é o tratamento de escolha para o CBNMI de alto risco, sendo considerada atualmente a imunoterapia que apresenta melhores resultados, superior inclusive à quimioterapia intravesical com relação às taxas de recorrência e progressão do tumor (Andreas & Brandau, 2003; Hall et al., 2007; Askeland et al., 2012).

A imunoterapia com BCG resulta em resposta imune massiva caracterizada pela indução da expressão de citocinas tanto na urina quanto na bexiga e influxo de células inflamatórias na parede vesical. Citocinas como TNF- $\alpha$ , fator estimulante de colônias de macrófagos (GMCSF), interferon (IFN) e ILs induzem resposta de linfócitos T-*helper* e das células NK na bexiga (Andreas & Brandau, 2003). De acordo com Schamhart et al. (2000), após a instilação de BCG, a parede vesical apresenta infiltrado celular granulomatoso, envolto

por linfócitos e granulócitos com indução de resposta imune de longa duração, a qual pode persistir por mais de um ano. Contudo, tal resposta varia amplamente nos pacientes e a possível correlação entre expressão de citocinas e resultado da terapia é alvo de intensa investigação (Schamhart et al., 2000). O uso de organismos vivos e atenuados pode causar efeitos colaterais e dificuldade em prever resposta. Os efeitos colaterais estão presentes em mais de 90% dos pacientes tratados com BCG, sendo que esses vão desde sintomas irritativos leves a moderados do sistema urinário até óbito, passando por complicações graves como instabilidade hemodinâmica, febre persistente ou reações alérgicas, comprometendo sua utilização (Lamm et al., 1986; Sylvester et al., 2002; Bohle & Brandau, 2003).

### **3.6- Perspectivas Terapêuticas para o CBNMI: Exercício Físico**

A inatividade física tem sido apontada frequentemente como um dos principais fatores responsáveis pelo desencadeamento de doenças crônico-degenerativas, obesidade, câncer entre outras (WHO, 2002). Nesse cenário, a realização periódica de exercícios físicos parece atuar como agente não farmacológico no controle dessas doenças (Horton & Hill, 1990; Brum et al., 2004).

Estudos experimentais em animais e humanos sugerem correlação entre a realização do exercício físico e a atenuação no desenvolvimento do câncer. De acordo com esses estudos, a atividade física apresentou um efeito protetor no desenvolvimento dos cânceres de mama e colo em modelos de roedores (Colditz et al., 1997; Friedenreich et al., 2001; Malicka et al. 2015). Lunz et al. (2008) demonstraram efeito preventivo do treinamento aeróbio de natação no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas em colo de ratos induzidos quimicamente pela 1,2- dimetilhidrazina (DMH). Esses mesmos autores concluíram que o efeito protetor do exercício aeróbio sobre a carcinogênese química do colo poderia estar

relacionada à diminuição do estresse oxidativo durante as etapas da carcinogênese desse órgão.

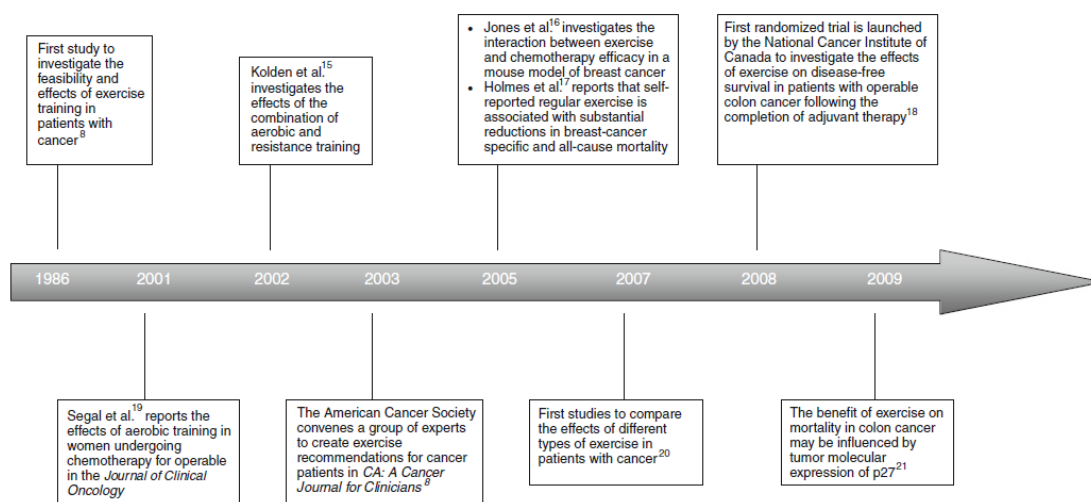
Como já mencionado anteriormente, a incidência de câncer está altamente relacionada ao estilo de vida dos indivíduos, como o sedentarismo e a obesidade (Schoenberg, 2009). A atividade física é benéfica à saúde mental e física (Paffenbarger, 1993). Em uma visão geral os pacientes que realizam exercício físico tem uma melhora na qualidade de vida global (Kalter et al 2016). Nesse sentido, a prática da atividade física ou de um treinamento específico (aeróbio ou resistido) pode colaborar no tratamento de depressão, ansiedade e outros distúrbios de natureza psicológica, bem como levar a melhora da força, equilíbrio e bem estar, melhorando a qualidade de vida das pessoas (Evans, 1999; Courneya, 2001; Bergasa, 2004). Além disso, Vieira et al. (2009) relataram efeitos benéficos da prática regular de exercícios físicos na diminuição do grau de inflamação do tecido acometido pelo câncer, mesmo na perda de gordura, diminuição dos níveis de resistência à insulina e aumento de adiponectina, este um marcador importante na proteção hepática. Segundo Aguiar e Silva et al. (2012) o exercício físico aeróbio diminuiu o desenvolvimento lesões pre-neoplásticas e adenomas hepáticos em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, reafirmando que o exercício em alguns tipos de neoplasias se mostra benéfico.

Em atletas, estudos demonstram aumento na defesa antioxidante endógena via catalase e superóxido dismutase (SOD) induzida pelo trabalho muscular (Ducan et al., 1997). Cronicamente, o treinamento físico promove maior síntese de catalase e SOD do organismo, a fim de suprimir as altas quantidades de espécies reativas do oxigênio (EROs) e estresse oxidativo celular decorrente de um maior consumo mitocondrial de oxigênio (Packer et al., 2007).

Em adição, a aptidão cardiorrespiratória, medida pela capacidade máxima de captação de oxigênio ( $VO_{2max}$ ), apresenta-se inversamente correlacionada às concentrações de

proteína C-reativa (Kuo et al., 2007), sugerindo menor atividade inflamatória em indivíduos treinados aerobicamente. Assim, o treinamento aeróbio regular tem sido apontado como uma medida adequada para ativação da defesa antioxidante e redução da atividade inflamatória do organismo (Kuo et al., 2007; Packer et al., 2007). Estudos mostram que quando falamos de neoplasias e exercício, procura-se claramente o bem estar e a melhor qualidade de vida do paciente (Cramp et al., 2010). Muitos estudos indicam que indivíduos, que vivem com o diagnóstico de neoplasias e que realizam o exercício físico, apresentam melhor qualidade de vida (Schmitz et al., 2005 and McNeely et al., 2006). O exercício melhora o sistema cardiovascular nos pacientes em geral em tratamento ou após tratamento do câncer, levando a diminuição dos efeitos colaterais da quimioterapia ou radioterapia (Schmitz et al., 2005).

O exercício físico está sendo usado com terapia complementar para vários tipos de cânceres. Este fato se deve a vários mecanismos onde a atividade física interfere no processo de desenvolvimento do câncer. Se tivermos um aumento na melhora obtida pela atividade física na prevenção de alguns tipos de câncer, ou no seu prognóstico, poderia ser uma boa estratégia de saúde pública o uso da atividade física como intervenção e redução no impacto do câncer com custos e riscos relativamente baixos (McTiernan, 2008). Os estudos com treinamento físico iniciaram-se com pesquisadores no final de 1980 (Figura 1), com uma intervenção apropriada para diminuir os efeitos da quimioterapia e a radiação que causavam fadiga e perda de aptidão cardiorrespiratória em mulheres com câncer de mama em estágio inicial (Winningham and MacVicar 1989; Winningham et al., 1989; MacVicar et al., 1989; Winningham, 1991; Gianni et al., 2001; Brown et al., 2003).



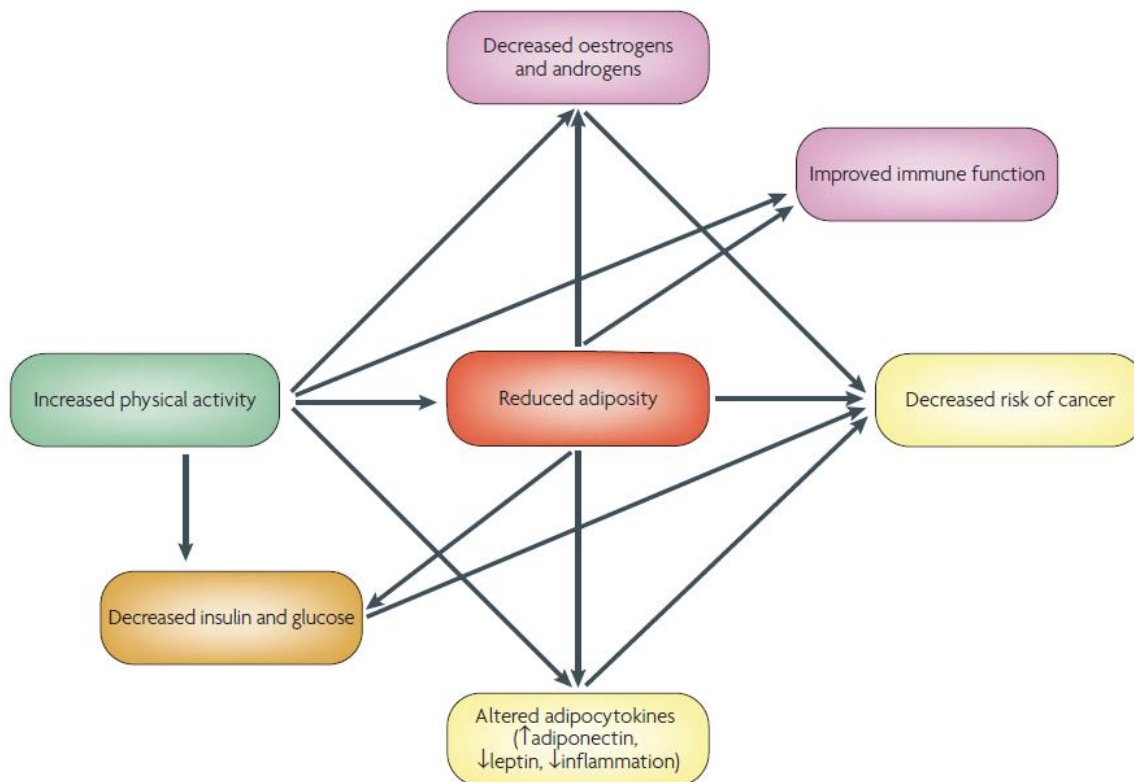
**Figura 1** – Linha do tempo da pesquisa sobre exercício físico na oncologia. Fonte: Jones et al., 2010.

O exercício se mostra muito importante no tratamento de varias doenças por ser uma medida eficaz e de baixo custo, contudo, é raro usar o exercício como parte eficiente de um tratamento (Leyk, 2009). Dessa forma, o exercício tem se mostrado muito eficaz no tratamento dos vários tipos de neoplasias, melhorando as condições de vida e mostrando-se útil terapêuticamente para as pessoas acometidas pelo câncer (Leyk, 2009).

A maioria das investigações experimentais enfatiza a eficácia do exercício sobre seus benefícios a cardiopatias, na qualidade de vida, sobrepeso e composição corporal. Por outro lado, alguns estudos relatam seus efeitos sobre importantes biomarcadores para o controle metabólico e funções imunológicas. (Jones, 2010). Entretanto, existem protocolos de exercício físico, que não se mostram benéficos na melhora do órgão alvo em alguns protocolos de carcinogênese química em ratos, provavelmente, devido ao volume e intensidade que foram realizados os protocolos de exercícios (Na, 2011). Contudo, Cramp et al. (2010) ressaltam em seu estudo que o treinamento de resistência combinado com o treinamento aeróbio pode ser também benéfico tanto quanto o treinamento aeróbio isolado.

Sendo assim, surge um novo campo de pesquisa na área do exercício-oncologia, onde os pesquisadores buscam abordar com maior ênfase o papel de exercício em pacientes acometidos pelo câncer em seu estágio inicial (Jones, 2010)

Diferentes linhas de pesquisa baseadas em evidências clínicas sugerem que algumas malignidades podem ser reduzidas com a prática de atividade física, sendo alguns órgãos apresentam uma maior predisposição a respostas positivas, como o colón, mama, próstata, endométrio e pulmão (Na, 2011). Adicionalmente, sabe-se que ambos os gêneros que praticam atividade física regularmente apresentam um menor risco de progressão tumoral (Schoenberg, 2009).



**Figura 2** – mecanismos hipotéticos ligando a atividade física ao risco de câncer. Atividade física pode funcionar através da redução da quantidade de tecido adiposo, o que reduz a produção de hormônios sexuais, insulina, marcadores inflamatórios e leptina, diminuindo assim a exposição a esses hormônios potencialmente cancerígenos e peptídeos e reduzindo o risco de câncer. Fonte: MC Tiernan., 2008.

A prática de exercícios ativa células da resposta imunológica, exemplos delas são os, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e linfócitos (Nieman, 1997). Em alguns trabalhos a prática de uma atividade física intensa (crônica), mostra uma relação dose resposta em J entre a intensidade da atividade física e o sistema imune. A atividade física feita com moderação melhora a resposta imunológica, enquanto o treino intenso exaustivo acarreta em imunossupressão (Wermore and Ulrich, 2006).

Se entendermos como os mecanismos da interrelação entre a atividade física e o desenvolvimento do câncer teremos evidências científicas para introduzir a atividade física no cotidiano individual e coletivo em clínicas e nos trabalhos de saúde pública preventiva.

Ja em outro plano, temos a visão de que com a identificação e o conhecimento destes mecanismos poderemos prescrever a atividade física com mais significancia para individuos acometidos pelo cancer ou não, (Figura 2), contribuindo para novas modalidades e tratamentos ( McTiernan, 2008). Segundo(Matthew & Emily (2010) os níveis de atividade física mais elevada (frequência e duração), ou seja exercícios moderados para vigorosos, parecem ter benefícios na modulação do risco de câncer de mama, junto com a atividade física recreativa onde os níveis são bem mais altos de proteção. Segundo a revisão de Courneya (2007), o exercício físico de resistência não acarreta em efeitos adversos aos pacientes acometidos pelo câncer. Já no câncer de bexiga o exercício física tem uma influencia muito importante na qualidade de vida dos pacientes (Gopalakrishna et al 2016)



## **4-JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

### **4.1- Justificativa**

O baixo grau de eficácia das terapias contra o CBNMI pode estar relacionado aos baixos efeitos dessas terapias sobre os mecanismos de reparo tecidual, angiogênese e enzimas antioxidantes. Em muitos cânceres, a natureza dos EROs que amplifica a lesão primária não é conhecida. Desta forma, torna-se difícil o planejamento correto da utilização de fármacos e/ou medidas não farmacológicas, como o exercício físico, com propriedades antioxidantes que eliminem diretamente o EROs, impedindo sua reação com alvos celulares ou interrompendo as cadeias radicalares e, assim, evitando a propagação das lesões tumorais provocadas por essas moléculas. Assim, o conhecimento da interação da imunoterapia vesical com BCG com o exercício físico aeróbio, bem como a interação dessas medidas terapêuticas com as enzimas antioxidantes é fundamental para o entendimento da carcinogênese urotelial.

O tratamento padrão do CBNMI, utilizando BCG, embora apresente indicações clínicas, traz efeitos colaterais indesejáveis e, muitas vezes, deletérios ao paciente. Sendo assim, qualquer tratamento outro que se mostre efetivo e menos lesivo, se faz de grande importância.

Em face do papel estratégico de novas modalidades terapêuticas e da necessidade de estudos específicos na área da carcinogênese urotelial, destaca-se o exercício físico aeróbio, o qual abre nova perspectiva no tratamento de alguns cânceres, incluindo o urotelial. A investigação de alterações estruturais e moleculares que possam ser alterados na carcinogênese da bexiga urinária pelo efeito do exercício físico, fornecerá elementos para avaliar sua indicação na prevenção e no tratamento dessa doença.

Cabe ressaltar que os trabalhos existentes não são conclusivos no sentido de relacionar os efeitos da imunoterapia com BCG e exercício físico aeróbio no CBNMI, bem como suas relações com os receptores do sistema imune inato, angiogênese e balanço oxidativo.

## **4.2 Objetivos**

Considerando a importância de tratamentos alternativos que reduzam as taxas de recorrência, progressão tumoral, bem como seu impacto na evolução clínica dos pacientes com CBNMI, os objetivos gerais deste estudo foram caracterizar e comparar os efeitos morfológicos e moleculares da imunoterapia intravesical com BCG associada ao exercício físico aeróbio no tratamento do CBNMI induzido em ratos, bem como estabelecer os efeitos dessas estratégias terapêuticas envolvendoos receptores do sistema imune inato, angiogênese e balanço oxidativo.

### **4.2.1 Objetivos específicos**

Os objetivos gerais foram alcançados através das seguintes especificidades:

- a) Caracterizar as lesões do CBNMI de ratos induzidos quimicamente e comparar a progressão tumoral frente à imunoterapia com BCG e exercício físico aeróbio;
- b) Caracterizar e comparar por meio de Western Blotting o envolvimento da imunoterapia com BCG e do exercício físico aeróbio com o balanço oxidativo (NOX1 e Nrf2) no CBNMI de ratos induzidos quimicamente;
- c) Caracterizar e comparar os efeitos da imunoterapia com BCG e do exercício físico aeróbio sobre os receptores do sistema imune indutores da inflamação aguda (TLR2, TLR4), (NF KB e IL-6) bem como o balanço angiogênico e antiangiogênico (VEGF e Endostatina) por imunomarcção no CBNMI de ratos induzidos quimicamente.
- d) Caracterizar e comparar por meio de Western Blotting o envolvimento da imunoterapia com BCG e do exercício físico aeróbio com a proliferação e apoptose( BAX e BCL-2) e

secreção de Matriz extracelular (MMP-2 e AKT) no CBNMI de ratos induzidos quimicamente;

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 – Animais e Procedimento Experimental**

No presente trabalho foram utilizadas 25 ratas da linhagem Fischer 344, na faixa etária de 7 semanas, pesando em média 150 gramas, obtidas no Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Para a indução do CBNMI, 20 animais foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (5mg/Kg i.p.; *König, São Paulo, Brasil*) e Cloridrato de Cetamina 10% (60mg/Kg, i.p.; *Fort Dodge, Iowa, EUA*), mantidos nesse estado por 45 minutos para evitar micção espontânea e instilada uma dose de 1,5 mg/Kg de *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU - *Sigma, St. Louis, MO, EUA*) dissolvida em 0,3 mL de citrato de sódio (1M pH 6,0) a cada 15 dias (semanas 0, 2, 4, 6), totalizando 4 doses (Fávaro et al., 2012). Os outros cinco animais que não receberam MNU foram considerados como **Grupo Controle (Grupo 1)** e receberam doses intravesicais de 0,3 mL de solução fisiológica 0,9% por 6 semanas consecutivas (Fávaro et al., 2012). Duas semanas após a última dose de MNU, os animais foram divididos em quatro grupos (5 animais cada):

- a) **Grupo MNU (Câncer, Grupo 2)**: recebeu o mesmo tratamento que o Grupo 1;
- b) **Grupo MNU+BCG (Grupo 3)**: recebeu uma dose intravesical de 0,3 ml da solução de 40 mgde BCG (*Instituto Butantan, São Paulo, Brasil*) diluída em 20 mL de solução fisiológica 0,9% (2mg/mL) por 6 semanas consecutivas (Fávaro et al., 2012);
- c) **Grupo MNU+EFA (Grupo 4)**: recebeu o mesmo tratamento que os Grupos 1 e 2, e simultaneamente submetido ao protocolo de exercício físico aeróbio (natação), ambos por 6 semanas consecutivas;

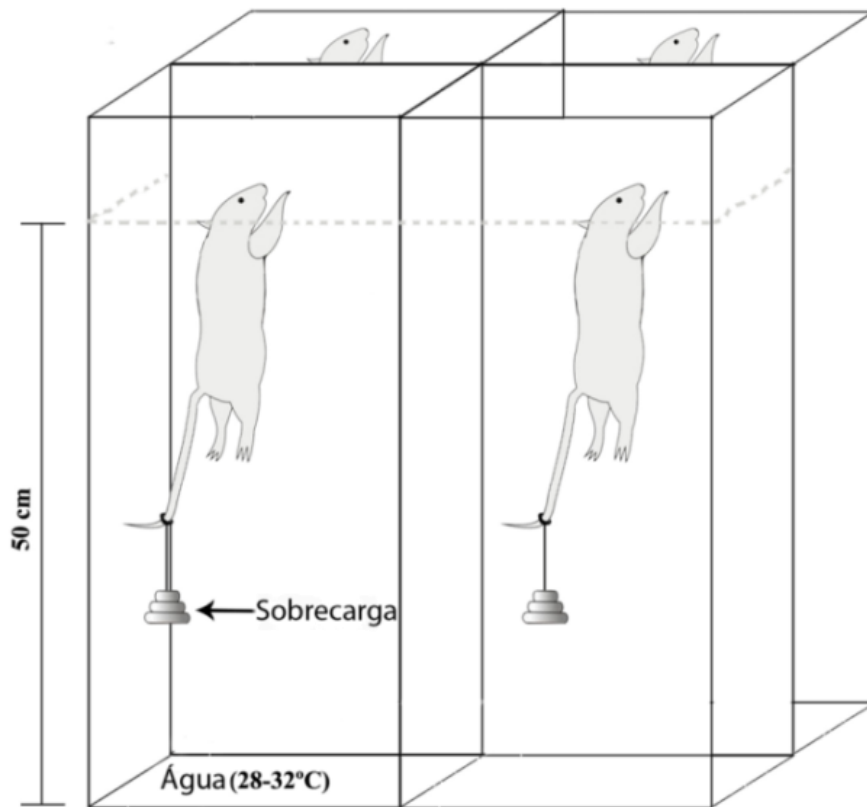
**d) Grupo MNU+EFA+BCG (Grupo 5):** recebeu uma dose intravesical de BCG conforme descrito no Grupo 3 e simultaneamente submetido ao protocolo de exercício físico aeróbio (natação), ambos por 6 semanas consecutivas.

As doses intravesicais nos diferentes grupos experimentais foram instiladas via cateter flexível 20 gauge (*Abocath, São Paulo, Brasil*). Os animais de todos os grupos experimentais receberam água e a mesma dieta sólida *ad libitum* (*Nuvilab, Colombo, PR, Brasil*). Após o tratamento, os animais foram eutanasiados e as bexigas urinárias coletadas e submetidas às análises histopatológicas e *Western Blotting*.

Os experimentos contidos no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética para Experimentação Animal/CEUA/IB/UNICAMP (**protocol no. 3707-1**).

### **5.1.1– Treinamento Físico Aeróbio- (EFA)**

Os animais dos grupos treinados foram submetidos a um programa de treinamento aeróbio de natação durante seis semanas (5 dias/semana), semelhante ao proposto por Gobatto (2001). Anterior ao treinamento foi realizado um período de 15 dias de adaptação dos animais ao meio líquido (Manchado et al., 2006). O treinamento foi realizado em um aquário subdividido em compartimentos individualizados, contendo água a 28-30°C e 70 cm de profundidade (figura 3 e 4). O volume (tempo) e intensidade (sobrecarga) de treinamento foram progressivos, sendo equivalentes a 10 minutos sem sobrecarga (1ª semana); 20 min, 1% (2ª semana); 25, 30, 35 e 40 min, 2% (do início ao final da 3ª semana); 45, 50, 55 e 60 min, 2% (do início ao final da 4ª semana) e 60 min, 2% (5ª a 6ª semana). As sessões de treinamento foram realizadas sempre no mesmo período do dia, entre 18 e 20h.



**Figura 3-** Aparato De Treinamento



**Figura 4-** Foto do aparato de treinamento

## 5.2– Análises Histopatológicas

A bexiga urinária de todos animais de cada grupo foi coletada e fixada (metade) em solução de Bouin por doze horas. Após a fixação, os tecidos foram lavados em álcool etílico a 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em xilol por 2 horas e inclusos em polímeros plásticos (*Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA*). Em seguida, os materiais foram seccionados no micrótomo rotativo *LeicaRM 2165 (Leica, Munique, Alemanha)* com espessura de 5µm, corados em Hematoxilina-Eosina e fotografados no fotomicroscópio *Zeiss Axiophot (Zeiss, Munique, Alemanha)*. Os diferentes grupos experimentais foram classificados conforme o estadiamento proposto pelo consenso da Organização Mundial da Saúde/Sociedade Internacional de Patologia Urológica (Epstein et al., 1998). As análises foram realizadas por um único examinador treinado, sendo três cortes por lâmina em profundidades diferentes.

## 5.3– Extração de Proteínas e *Western Blotting*

Amostras da bexiga urinária (metade) foram coletadas de todos os animais de cada grupo experimental, congeladas e, posteriormente, submetidas as análises de *Western Blotting*. Os fragmentos foram homogeneizados em tampão de extração, e os extratos obtidos por centrifugação durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford e as leituras feitas por ELISA (*Multi-Mode Microplate Reader Synergy HIM; Bio-Tek Instruments, EUA*). O correspondente a 70 microgramas de proteínas foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas *overnight* com anticorpos primários específicos para a detecção dos antígenos TLR2, TLR4, NF-kB, MMP-2, IL-6, AKT, VEGF, Endostatina, NOX1, Nrf2, Bcl-2 e BAX, diluídos em albumina de soro bovino (BSA) 1% (**Tabela 1**). Posteriormente, as membranas

foram lavadas com TBS-T e incubadas por 2 horas com anticorpos secundários (Anti-Rabbit IgG, A6154, *Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA*; Anti-Mouse IgG, A2304, *Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA*; Anti-Goat IgG, AP106P, *Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha*) diluídos em BSA 1%. Após nova série de lavagens com TBS-T, a atividade peroxidásica foi revelada com o cromógeno diaminobenzidina (DAB). As análises de *Western blotting* foram realizadas em duplicata, sendo que as amostras da bexiga urinária foram reunidas a partir de 5 animais por grupo para cada repetição. A densitometria semi-quantitativa (IOD - Densidade Óptica Integrada) das bandas foi realizada utilizando o programa 1.47v *NIH ImageJ (National Institute of Health, EUA Disponível em: [Http://rsb.info.nih.gov/ij/](http://rsb.info.nih.gov/ij/))*, seguido pela análise estatística. O anticorpo para  $\beta$ -actina foi utilizado como controle positivo endógeno para normalização das leituras da intensidade de marcação das bandas. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão da razão entre a intensidade de cada banda pela intensidade da banda de  $\beta$ -actina (Garcia et al., 2015).

**Tabela 1:** Características dos Anticorpos Primários para *Western Blotting*.

<b><i>Anticorpos Primários</i></b>	<b><i>Espécie hospedeira</i></b>	<b><i>Código</i></b>	<b><i>Fonte</i></b>
TLR2	Coelho (Policlonal)	251110	<i>Abbotec, San Diego, CA, EUA</i>
TLR4	Coelho (Policlonal)	251111	<i>Abbotec, San Diego, CA, EUA</i>
NF- $\kappa$ B	Coelho (Policlonal)	ab7970	<i>Abcam, Cambridge, MA, EUA</i>
IL-6	Coelho (Policlonal)	ab6672	<i>Abcam, Cambridge, MA, EUA</i>
MMP-2	Coelho (Policlonal)	ab37150	<i>Abcam, Cambridge, MA, EUA</i>
AKT	Coelho (Monoclonal)	ab81283	<i>Abcam, Cambridge, MA, EUA</i>
VEGF	Camundongo(Mono clonal)	sc-53462	<i>Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA</i>
Endostatina	Camundongo (Monoclonal)	ab64569	<i>Abcam, Cambridge, MA, EUA</i>
NOX1	Coelho (Policlonal)	bs-3682R	<i>Bioss Inc., EUA</i>
Nrf2	Coelho (Policlonal)	ab31163	<i>Abcam, Cambridge, MA, EUA</i>
Bcl-2	Coelho (Policlonal)	ab59348	<i>Abcam, Cambridge, MA, EUA</i>
BAX	Coelho (Policlonal)	ab7977	<i>Abcam, Cambridge, MA, EUA</i>
$\beta$ -actina	Camundongo (Monoclonal)	sc-47778	<i>Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA</i>



#### **5.4– Análises Estatísticas**

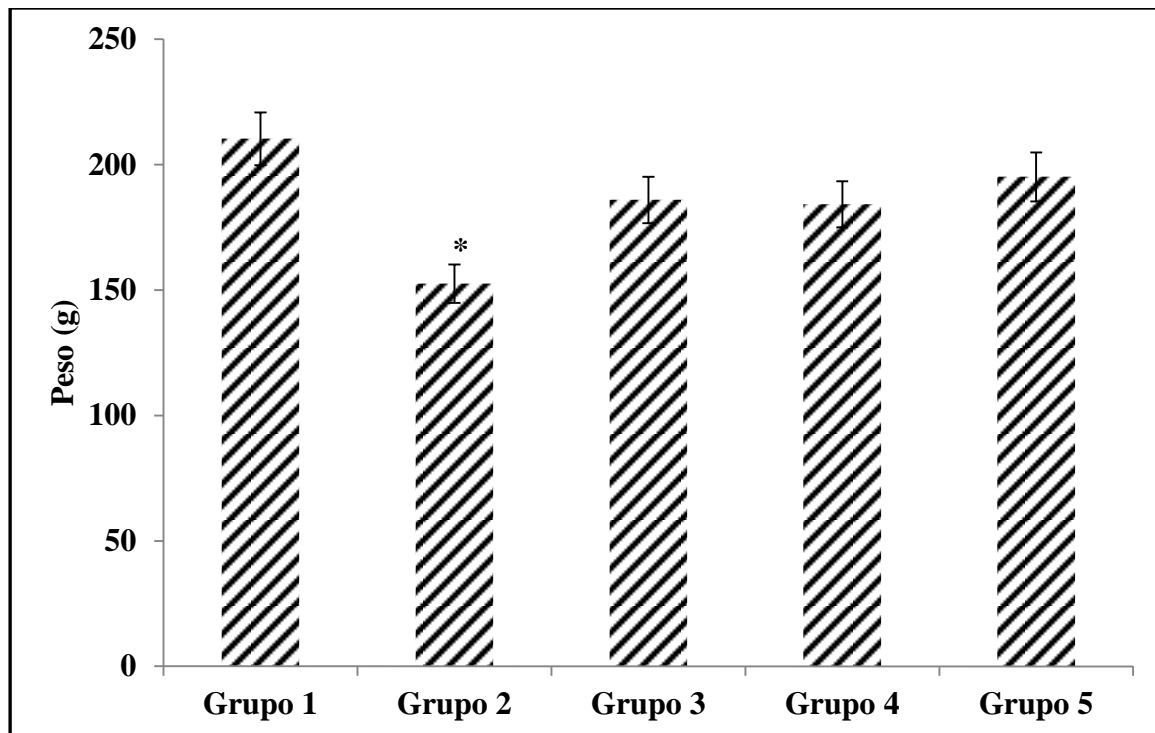
Os parâmetros quantificados (análises histopatológicas, peso corporal e *Western Blotting*) foram analisados estatisticamente para os diferentes grupos experimentais. Para as análises histopatológicas foram empregados o teste de proporção, sendo que para essas análises o erro tipo-I de 5% foi considerado estatisticamente significativo.

Para as análises estatísticas do peso corporal e *Western Blotting* foi empregado o Test-T e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey *post hoc* para comparação entre médias. Tais análises foram realizadas com nível de significância de 1% e 5%, e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Modalidades Terapêuticas Baseadas na Imunoterapia Intravesical com BCG e Exercício Físico Aeróbio (EFA) Atenuam o Peso Corporal

Ao final do experimento, os animais dos grupos MNU+BCG, MNU+EFA e MNU+EFA+BCG apresentaram peso corporal médios próximos ao do grupo Controle. O Grupo MNU apresentou redução significativa no peso corporal quando comparado aos demais grupos experimentais (**Gráfico 1**).



**Gráfico 1: Médias e Desvio-Padrão dos Pesos Corporais dos Diferentes Grupos Experimentais ao Final do Experimento.** Grupos: Controle (Grupo 1), MNU (Grupo 2), MNU+BCG (Grupo 3), MNU+EFA (Grupo 4) e MNU+EFA+BCG (Grupo 5)

\*Significância estatística ( $P < 0,05$ )

## **6.2. Imunoterapia Intravesical com BCG Associada ao Exercício Físico Aeróbio (EFA) Reduz a Agressividade Tumoral**

A bexiga urinária dos animais do grupo Controle não apresentou lesões. O urotélio foi composto por 2 - 3 camadas, sendo: uma camada de células basais, uma camada celular intermédia, e uma camada superficial ou apical composta por células em guarda-chuva (**Figuras 1a, 1b; Tabela 2**).

Em contraste, a bexiga urinária dos animais do grupo MNU apresentou alterações histopatológicas, tais como: carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1) (**Figuras 1c, 1d**) e carcinoma papilífero (pTa) de alto grau em 80% e 20% dos animais, respectivamente (**Tabela 2**). O carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1) foi caracterizado por células neoplásicas agrupadas em pequenos grupos ou cordões, invadindo a lâmina própria, numerosas figuras de mitose e células pleomórficas com núcleos aumentados. A metaplasia escamosa foi caracterizada por grupos de células escamosas com queratinização e mínimo pleomorfismo nuclear. O carcinoma papilífero (pTa) foi caracterizado por lesões papilíferas, com células uroteliais em arranjo desordenado e com perda da polaridade, núcleos pleomórficos com nucléolos proeminentes e grandes núcleos hipercromáticos.

O carcinoma *in situ* (pTis) (**Figuras 1e, 1f**) e os carcinomas papilíferos (pTa) de alto e baixo graus foram as alterações histopatológicas mais frequentes na bexiga urinária do grupo MNU+BCG e ocorreram em 60%, 20%, e 20% dos animais, respectivamente (**Tabela 2**). O carcinoma *in situ* (pTis) foi caracterizado por uma desordenada proliferação das células uroteliais (hiperplasia) em um urotélio plano, com acentuadas atipias celulares caracterizadas por núcleos volumosos, redução do citoplasma e nucléolos múltiplos e proeminentes.

As alterações histopatológicas mais frequentes no grupo MNU+EFA foram o carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1) e os carcinoma papilíferos (pTa) de

alto e baixo graus em 60%, 20% e 20% dos animais, respectivamente (**Figuras 2a, 2b; Tabela 2**).

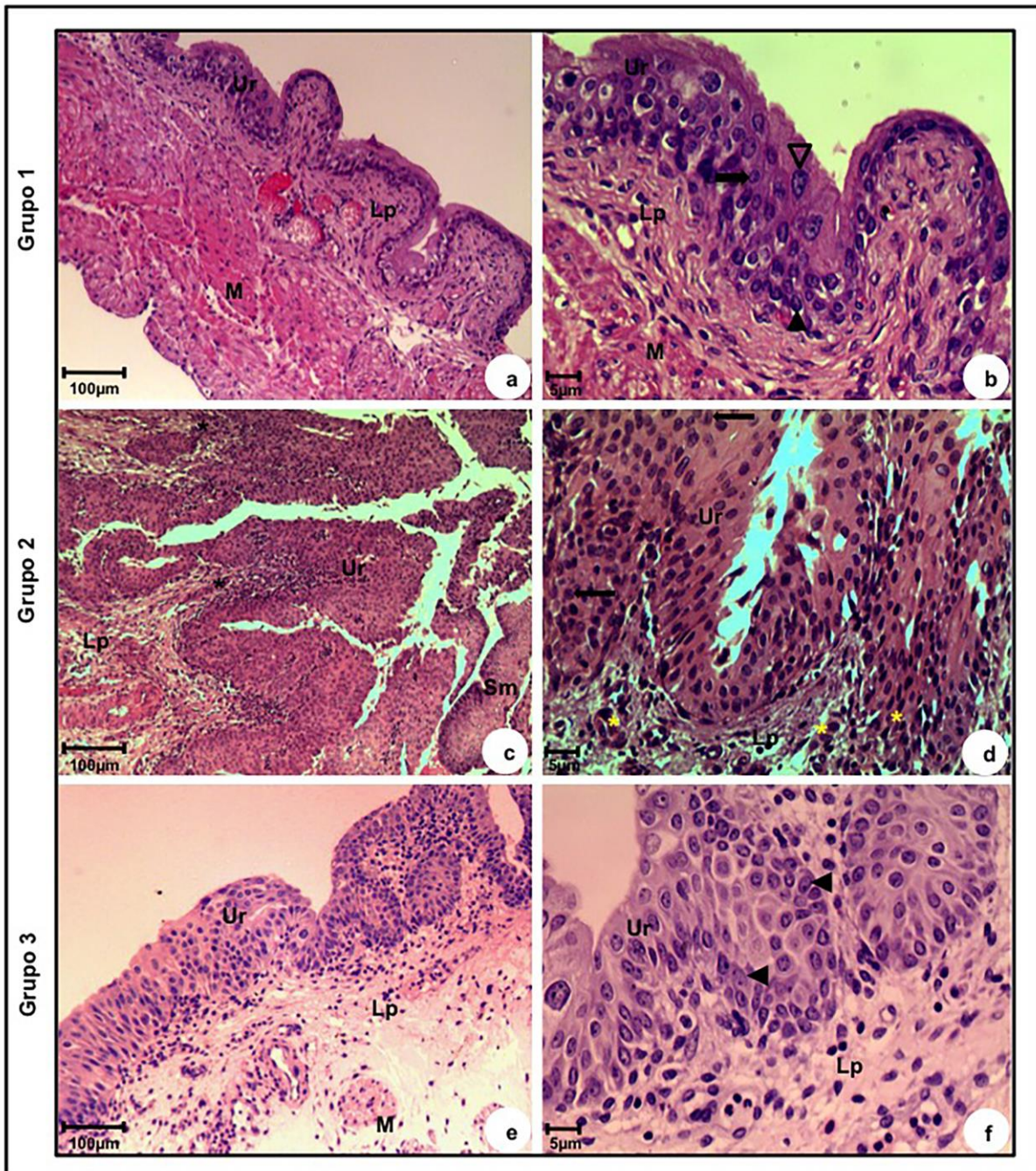
As características histopatológicas do grupo MNU+EFA+BCG foram o carcinoma *in situ* (pTis) e o carcinoma papilífero (pTa) de baixo grau em 80% e 20% dos animais, respectivamente (**Figuras 2c, 2d; Tabela 2**).

A ocorrência de metaplasia escamosa queratinizante foi observada em 80% dos animais do grupo MNU e 60% no grupo MNU+EFA, sendo ausente nos demais grupos experimentais.

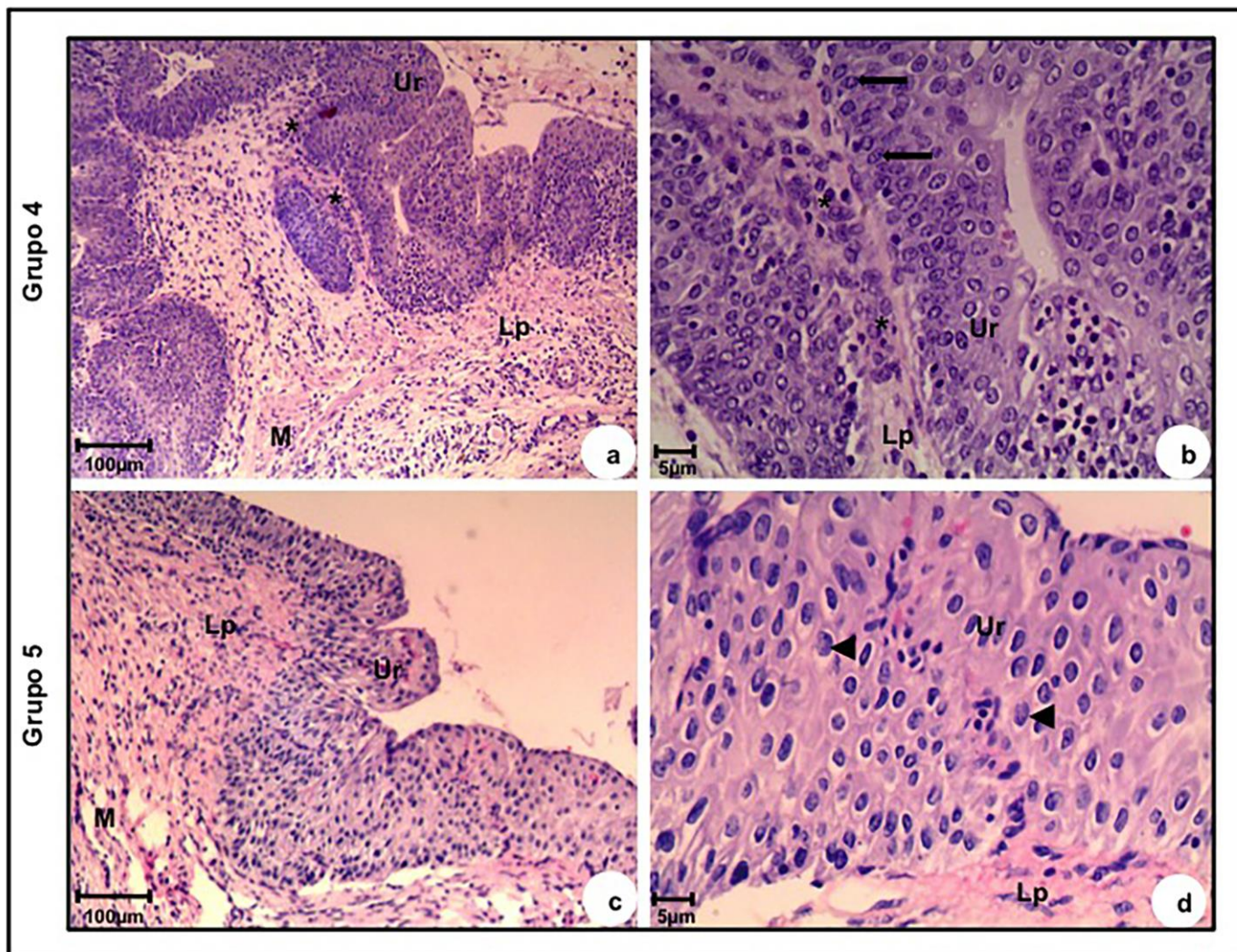
**Tabela 2:** Porcentagem de alterações histopatológicas na bexiga urinária de ratos dos grupos Experimentais.

Histopatologia	Grupos				
	Grupo 1 (n=5)	Grupo 2 (n=5)	Grupo 3 (n=5)	Grupo 4 (n=5)	Grupo 5 (n=5)
Normal	05 (100%)	-	-	-	-
Neoplasia Intraurotelial de alto grau – Carcinoma <i>in situ</i> (pTis)	-	-	03 (60%)*	-	04 (80%)*
Carcinoma Urotelial Papilífero (pTa) de baixo grau	-	-	01 (20%)*	01 (20%)*	01 (20%)*
Carcinoma Urotelial Papilífero (pTa) de alto grau	-	01 (20%)*	01 (20%)*	01 (20%)*	-
Carcinoma Urotelial com Invasão da Lâmina Própria (pT1)	-	04 (80%)*	-	03 (60%)*	-

\*Significância estatística (teste de proporção,  $P < 0,0001$ ). Controle (Grupo 1), MNU (Grupo 2), MNU+BCG (Grupo 3), MNU+EFA (Grupo 4) e MNU+EFA+BCG (Grupo 5).



**Figuras 1a – 1f:** Fotomicrografias das bexigas urinárias dos grupos: Grupo 1: Controle(a, b), Grupo 2: MNU (c, d) e Grupo 3: MNU+BCG (e, f). (a), (b) Urotélio normal composto por 2-3 camadas: uma camada de células basais (**cabeça de seta fechada**), uma camada intermédia de células (**seta**), e uma camada superficial ou apical composta por células em guarda-chuva (**cabeça de seta aberta**). (c), (d) Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1): células neoplásicas dispostas em pequenos grupos (**asteriscos**) invadindo a lâmina própria; metaplasia escamosa (**Sm**); figuras de mitose (**setas**). (e), (f) Carcinoma *in situ* (pTis), caracterizado por atipia celular: núcleos volumosos (**cabeças de setas fechadas**) com citoplasma reduzido e nucléolos proeminentes. a - f: **Lp** – lâmina própria, **M** - camada muscular, **Ur** - urotélio.



**Figuras 2a – 2d:** Fotomicrografias das bexigas urinárias dos grupos: Grupo 4: MNU+EFA(a, b) e Grupo 5: MNU+EFA+BCG (c, d). (a), (b) Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1): células neoplásicas dispostas em pequenos grupos (**asteriscos**) invadindo a lâmina própria; figuras de mitose (**setas**). (c), (d) Carcinoma *in situ* (pTis), caracterizado por atipia celular: núcleos volumosos (**cabeças de setas fechadas**) com citoplasma reduzido e nucléolos proeminentes. a - d: **Lp** – lâmina própria, **M** - camada muscular, **Ur** - urotélio.



### **6.3. Associação entre Imunoterapia Intravesical com BCG e Exercício Físico Aeróbio (EFA) Estimula o Sistema Imune Inato e Induzem o Aumento de Citocinas Inflamatórias**

Houve aumento significativo dos níveis proteicos para TLR2 nos grupos MNU+BCG e MNU+EFA+BCG quando comparados aos demais grupos experimentais (**Figura 4**). Além disso, esses níveis proteicos foram significativamente maiores no grupo Controle em comparação aos grupos MNU e MNU+EFA (**Figura 4**). Similarmente, os níveis proteicos para TLR4 foram significativamente maiores nos grupos MNU+BCG e MNU+EFA+BCG em relação aos demais grupos experimentais (**Figura 3**). Além disso, esses níveis foram significativamente maiores nos grupos Controle e MNU+EFA em relação ao grupo MNU (**Figura 4**).

Os níveis proteicos para NF-kB foram significativamente maiores nos grupos MNU+BCG e MNU+EFA+BCG em comparação aos grupos MNU+EFA, Controle e MNU, os quais apresentaram valores menores (**Figura 4**). Similarmente, houve um aumento significativo dos níveis proteicos para IL-6 nos grupos MNU+BCG e MNU+EFA+BCG quando comparados aos demais grupos experimentais (**Figura 4**). Além disso, esses níveis proteicos foram significativamente maiores no grupo Controle em comparação aos grupos MNU+EFA e MNU (**Figura 4**).

#### **6.4. Imunoterapia Intravesical com BCG Associada ao Exercício Físico Aeróbio**

##### **(EFA) Suprime a Angiogênese**

Os níveis proteicos para VEGF foram significativamente menores nos grupos MNU+BCG e MNU+EFA+BCG em comparação ao grupo MNU (**Figura 5**). Adicionalmente, esses níveis proteicos de VEGF foram similares entre os grupos MNU e MNU+EFA (**Figura 5**).

Em contraste, os níveis proteicos para Endostatina foram significativamente maiores no grupo MNU+EFA+BCG quando comparados aos demais grupos experimentais (**Figura 5**). Além disso, esses níveis foram significativamente maiores no grupo MNU+BCG em relação aos grupos Controle, MNU+EFA e MNU, os quais apresentaram valores menores (**Figura 5**).

### **6.5. Associação entre Imunoterapia Intravesical com BCG e Exercício Físico Aeróbico (EFA) Reduz os Níveis Proteicos dos Fatores Indutores de Lesão (AKT e MMP-2), Culminando com Aumento da Apoptose (BAX) e Diminuição da Proliferação Celular (Bcl-2)**

Os níveis proteicos para MMP-2 foram significativamente menores nos grupos Controle e MNU+EFA+BCG em comparação aos demais grupos experimentais (**Figura 5**). Adicionalmente, esses níveis foram significativamente menores no grupo MNU+EFA em relação aos grupos MNU+BCG e MNU (**Figura 5**).

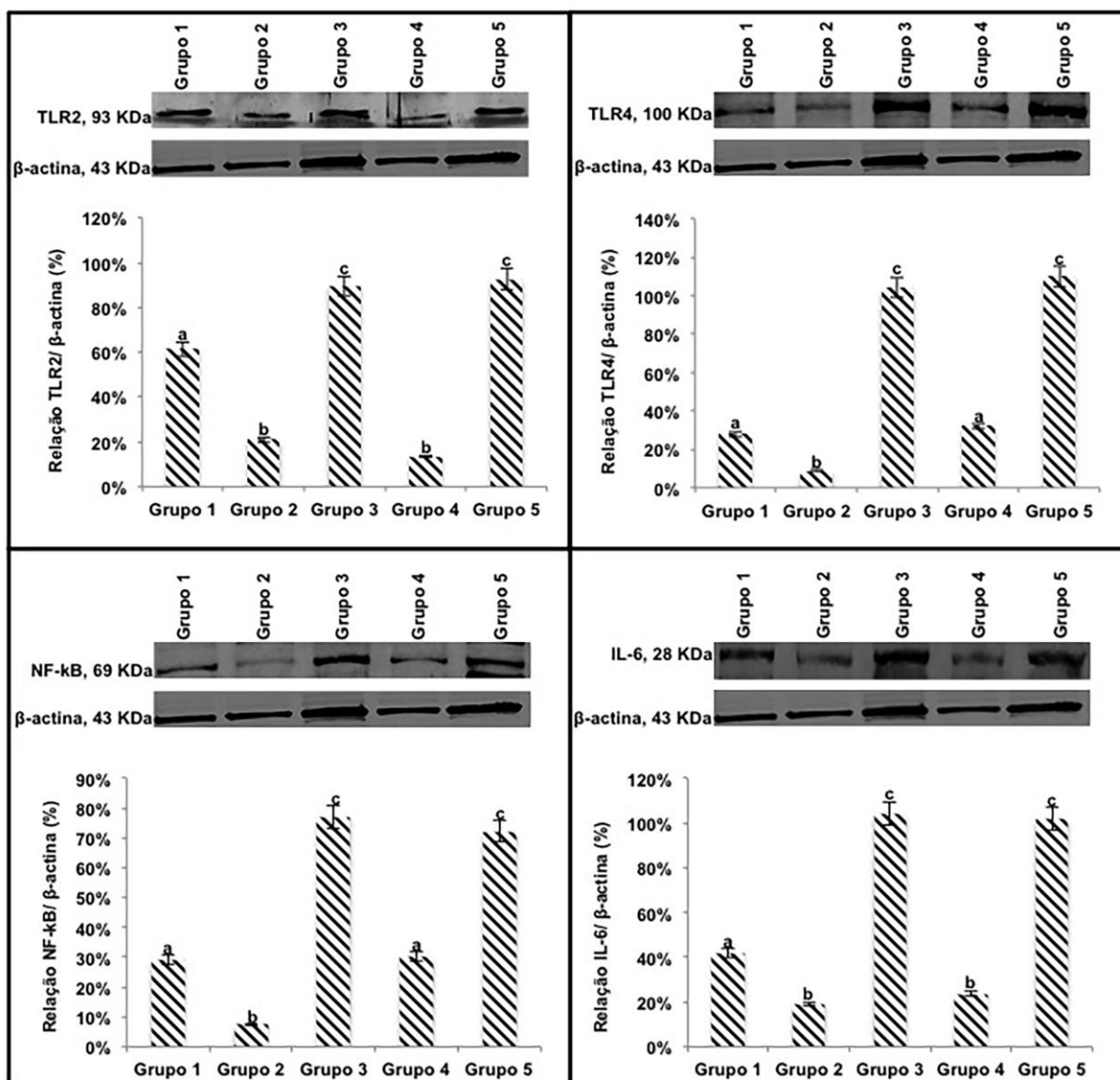
Similarmente, os níveis proteicos para AKT foram significativamente menores nos grupos Controle e MNU+EFA+BCG em comparação ao grupo MNU (**Figura 5**). Adicionalmente, esses níveis foram significativamente menores nos grupos MNU+BCG e MNU+EFA em relação ao grupo MNU (**Figura 5**).

Os níveis proteicos para Bcl-2 foram significativamente menores nos grupos Controle e MNU+EFA+BCG em comparação ao grupo MNU (**Figura 6**). Adicionalmente, esses níveis foram significativamente menores no grupo MNU+BCG em relação aos grupos MNU e MNU+EFA (**Figura 6**). Em contraste, os níveis proteicos para BAX foram significativamente maiores no grupo MNU+EFA+BCG em relação aos demais grupos experimentais (**Figura 6**). Ainda, esses níveis foram significativamente maiores nos grupo MNU+BCG em relação aos grupos Controle, MNU+EFA e MNU (**Figura 6**).

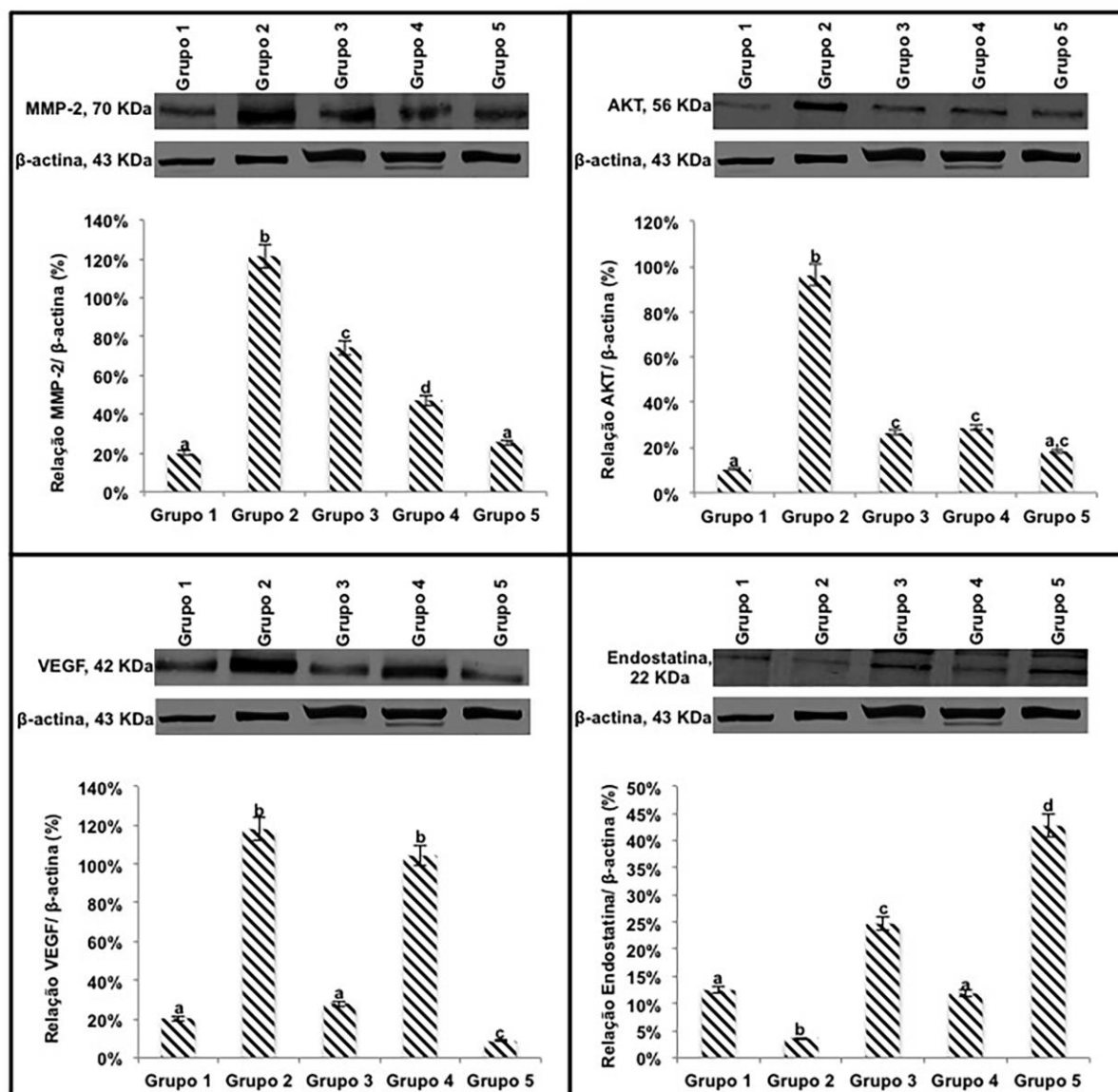
## **6.6. Imunoterapia Intravesical com BCG Associada ao Exercício Físico Aeróbio Altera o Balanço Oxidativo, Reduzindo os Níveis Proteicos de NOX1 e Aumentando os de Nrf2**

Os níveis proteicos para NOX1 foram significativamente menores nos grupos MNU+EFA+BCG e Controle e em comparação aos demais grupos experimentais (**Figura 6**). Adicionalmente, esses níveis foram significativamente menores nos grupos MNU+EFA e MNU+BCG em relação ao grupo MNU (**Figura 6**).

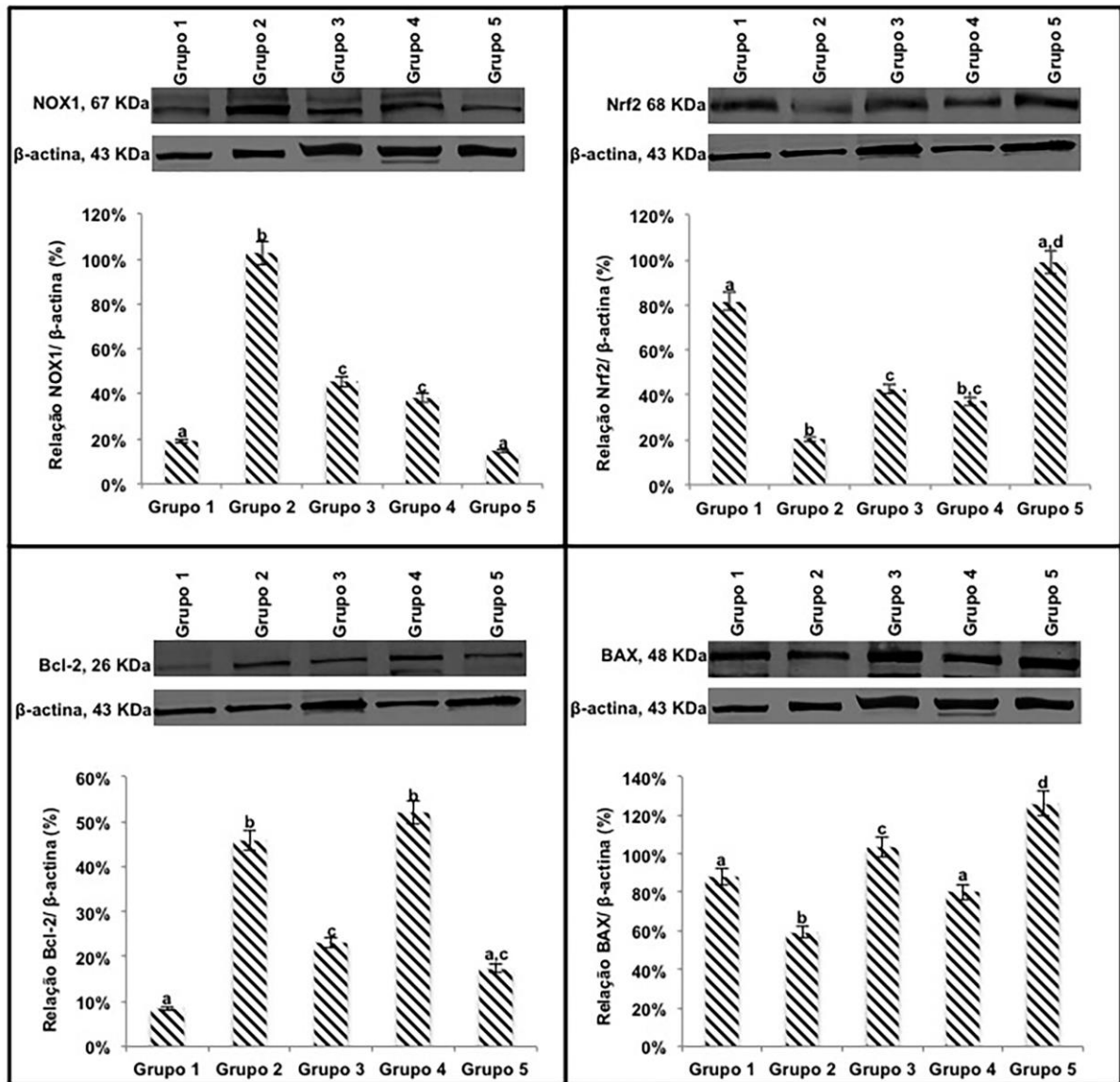
Em contraste, os níveis proteicos para Nrf2 foram significativamente maiores nos grupos MNU+EFA+BCG e Controle em relação aos demais grupos experimentais (**Figura 6**). Ainda, esses níveis foram significativamente maiores nos grupos MNU+BCG e em relação ao grupo MNU (**Figura 6**).



**Figura 5:** *Western Blotting* representativos e determinação semi-quantitativa dos níveis proteicos de TLR2, TLR4, NF-kB e IL-6. As amostras de bexiga urinária foram reunidas a partir de 5 animais por grupo para cada repetição (duplicata) e usadas para as análises de densitometria semi-quantitativa (IOD - Densidade Óptica Integrada) dos níveis de TLR2, TLR4, NF-kB e IL-6, seguidas de normalização para  $\beta$ -actina. Todos os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão. Diferentes letras minúsculas (a, b, c, d) indicam diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre os grupos após o teste de Tukey. Grupos: Controle (Grupo 1); MNU (Grupo 2); MNU+BCG (Grupo 3); MNU+EFA (Grupo 4) e MNU+EFA+BCG (Grupo 5).



**Figura 5:** *Western Blotting* representativos e determinação semi-quantitativa dos níveis proteicos de MMP-2, AKT, VEGF e Endostatina. As amostras de bexiga urinária foram reunidas a partir de 5 animais por grupo para cada repetição (duplicata) e usadas para as análises de densitometria semi-quantitativa (IOD - Densidade Óptica Integrada) dos níveis de MMP-2, AKT, VEGF e Endostatina, seguidas de normalização para  $\beta$ -actina. Todos os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão. Diferentes letras minúsculas (a, b, c, d) indicam diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre os grupos após o teste de Tukey. Grupos: Controle (Grupo 1); MNU (Grupo 2); MNU+BCG (Grupo 3); MNU+EFA (Grupo 4) e MNU+EFA+BCG (Grupo 5).



**Figura 6:** *Western Blotting* representativos e determinação semi-quantitativa dos níveis proteicos de NOX1, Nrf2, Bcl-2 e BAX. As amostras de bexiga urinária foram reunidas a partir de 5 animais por grupo para cada repetição (duplicata) e usadas para as análises de densitometria semi-quantitativa (IOD - Densidade Óptica Integrada) dos níveis de NOX1, Nrf2, Bcl-2 e BAX, seguidas de normalização para  $\beta$ -actina. Todos os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão. Diferentes letras minúsculas (a, b, c, d) indicam diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre os grupos após o teste de Tukey. Grupos: Controle (Grupo 1); MNU (Grupo 2); MNU+BCG (Grupo 3); MNU+EFA (Grupo 4) e MNU+EFA+BCG (Grupo 5).

## 7- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo indicam que as administrações intravesicais de MNU induziram lesões uroteliais caracterizadas por carcinoma papilífero (pTa) de alto grau e carcinoma com invasão da lâmina própria (pT1) no grupo MNU, como previamente descrito por (Fávaro et al 2012). Nos demais grupos foram detectadas neoplasia intraurotelial de alto grau (pTis) e carcinoma papilífero de baixo e alto grau (pTa) no grupo MNU-BCG; carcinomas papilíferos de baixo e alto grau (pTa) e carcinomas com invasão da lâmina própria (pT1) no grupo MNU+EFA e neoplasia intraurotelial de alto grau (pTis) e carcinoma papilífero de baixo grau (pTa) no grupo MNU-BCG+EFA. Além disso, nos dois grupos submetidos ao tratamento com BCG não foram observadas lesões uroteliais invasivas. As lesões uroteliais observadas no grupo MNU+BCG+Exercício são de melhor prognóstico do que as observadas no grupo MNU. Além disso, neste grupo não foram observadas reações adversas como hematúria, a qual somente foi observada nos animais dos grupos MNU, MNU+EFA e MNU+BCG.

Os resultados indicam menor incidência de lesões uroteliais de maior severidade nos grupos tratados com BCG, em especial no grupo MNU+BCG+EFA em relação ao grupo MNU, indicando um potencial benéfico da associação BCG/Exercício Físico. Entretanto, deve-se ressaltar que estudos adicionais com um número maior de animais por grupo devem ser conduzidos como preconizados para estudos de carcinogênese pelas agências governamentais regulatórias dos EUA e Europa (Jacobs and Hatfield, 2013).

O papel dos receptores *Toll-like* (TLRs) no câncer é uma questão controversa, pois diferentes estudos demonstraram que os TLRs podem atuar como reguladores negativos ou positivos da carcinogênese (Galli et al., 2010; Matijevic & Pavelic, 2010). Diferentes autores demonstraram que os TLRs podem ajudar as células tumorais a escapar da resposta do sistema imune (Huang et al., 2007), enquanto outros estudos mostraram que a expressão dos



TLRs nas células tumorais pode levá-las à apoptose ou outros tipos de morte celular (Huang et al., 2007; Salaun et al., 2007; Galli et al., 2010). A evidência contraditória dos TLRs pode ser explicada pela diferente intensidade e natureza da resposta inflamatória (Galli et al., 2010).

Compostos ou moléculas que agem como agonistas dos TLRs, ou seja, que se ligam e ativam TLRs, são objetos de intensa pesquisa e desenvolvimento de tratamentos contra o câncer. TLRs tem um importante papel na ativação da imunidade inata e adaptativa em resposta a patógenos e sinais de perigo (LaRue et al., 2013). Esses receptores são expressos em células do sistema imunológico e em alguns tipos de epitélios do organismo animal e humano (Ayari et al., 2011; LaRue et al., 2013). Eles são expressos no epitélio da bexiga urinária, onde participam ativamente contra infecções por patógenos (LaRue et al., 2013). A expressão dos TLRs é reduzida em cânceres de bexiga, especialmente em tumores não-músculo-invasivos (CBNMI) (Ayari et al., 2011; Stopiglia et al., 2015). A ativação de TLR em células tumorais pode levar a respostas antitumorais, visto que muitos estudos tem demonstrado uma citotoxicidade direta de agonistas de TLR em linhagens celulares de câncer de bexiga e um efeito antitumoral *in vivo* (Hennessy et al., 2010; So & Ouchi, 2010; Goutagny et al., 2010; LaRue et al., 2013). Ainda que TLRs sejam mais expressos em células uroteliais normais, sua expressão e atividade persistem em células tumorais, oferecendo a possibilidade de se utilizar ligantes de TLR para terapia. O sucesso da imunoterapia para CBNMI com BCG mediada por TLR sugere que imunoterapias alternativas baseadas em TLRs possam também ser bem sucedidas para esses cânceres. Fávoro et al. (2012) e Garcia et al. (2015) demonstraram em modelo animal para CBNMI que BCG aumentou os níveis proteicos dos TLRs 2 e 4 e TNF- $\alpha$ , sendo que esse aumento foi correlacionado com a diminuição da progressão tumoral. Assim, os resultados do presente estudo indicam que a imunoterapia com BCG aumentou os níveis proteicos dos TLRs 2 e 4 e dos intermediários da

via de sinalização canônica, via de produção de citocinas inflamatórias tais como NF-kB, IL-6. Esses dados estão de acordo com a literatura no que se refere aos mecanismos que levam à ativação de NF-kB/IL-6 (Dolcet et al., 2005). Além disso, deve-se mencionar que o exercício físico por si teve um efeito de forma significativa nos níveis de TLRs 4, NF-kB.

A angiogênese é um processo central para a progressão do tumor. O VEGF estimula todos os aspectos da função endotelial como proliferação, migração, produção de óxido nítrico e permeabilidade de células endoteliais (Van Ginkel et al., 2015). Além disso, a ação do VEGF protege as células endoteliais da apoptose, promovendo um aumento na viabilidade das células tumorais (Verdegem et al., 2014). Na ausência de neovascularização, os tumores sólidos não crescem além de 1 a 2mm, demonstrando que o crescimento tumoral e a metástase são dependentes da angiogênese (Folkman, 1995). Os níveis de VEGF possuem impacto no prognóstico e na taxa de mortalidade dos pacientes com câncer de bexiga. A elevada expressão de VEGF tem sido correlacionada com o aumento da agressividade desse tipo de tumor (Kerigh et al., 2010). Kerigh et al. (2010) demonstraram níveis aumentados de VEGF na urina de pacientes com tumores de bexiga de baixo e alto graus. Esses mesmos autores verificaram que após a terapia intravesical com BCG esses níveis diminuíram significativamente nos pacientes com tumores de baixo grau, mas permaneceram elevados nos tumores de alto grau. No presente estudo foi observado que a associação entre a imunoterapia com BCG e exercício físico foi mais eficaz no balanço angiogênico e anti-angiogênio em relação aos tratamentos isolados. Essa associação reduziu significativamente os níveis de VEGF e elevou o contrarregulador endógeno da angiogênese, a Endostatina, contribuindo para a redução da agressividade tumoral.

Outro resultado importante do presente estudo foi que a imunoterapia com BCG e BCG+EFA foram efetivas em manter equilíbrio angiogênico na carcinogênese urotelial através da redução dos níveis proteicos de VEGF e aumento dos níveis de endostatina. No

tratamento com MNU+EFA, os níveis proteicos de VEGF continuaram elevados em relação ao tratamento com BCG+EFA. Os níveis aumentados de VEGF e a diminuição dos níveis de endostatina podem se correlacionar com a desregulação do NF-kB e da proteína p53. Dolcet et al. (2005) demonstraram que a desregulação do NF-kB inibe a apoptose, aumenta a proliferação celular e promove a angiogênese. Assim a quantificação de vasos neoformados próximos as lesões uroteliais ou no estroma das lesões papilíferas, utilizando marcadores imuno-hisquímicos específicos CD31/CD34, poderiam dar uma panorama geral sobre o processo de angiogênese nesta fase da carcinogênese urotelial.

Estudos demonstraram que atletas possuem níveis aumentados de enzimas antioxidantes, como catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), induzidos pelo trabalho muscular (Ducan et al., 1997; Packer et al., 2007). Cronicamente, o exercício físico promove maior síntese de CAT e SOD, a fim de suprimir as altas quantidades de EROs decorrentes do consumo mitocondrial aumentado de oxigênio (Packer et al., 2007). Muitos estudos relacionam a expressão de genes da família NOX ao aumento da geração de EROs em diversos tipos de câncer, sendo que NOX1 tem expressão aumentada nos cânceres de cólon, gástrico, próstata e bexiga (Huang et al., 2005). Khandrika et al. (2009) e Shimada et al. (2011) apontam que a NOX é dismutada para formar  $H_2O_2$ , sendo que elevadas quantidades de  $H_2O_2$  são produzidas e excretadas pelas células tumorais, confirmando sua importância na propagação e invasão tumoral. Adicionalmente, Shimada et al. (2011) demonstraram que NOX1 e NOX4 foram responsáveis pela manutenção de EROs intracelular tanto nos carcinomas uroteliais não-músculo invasivos de baixo e alto graus como nos tumores músculo invasivos, demonstrando que essas proteínas estão envolvidos desde as etapas iniciais da carcinogênese urotelial até o desenvolvimento da doença músculo invasiva. Corroborando com a literatura, o presente estudo demonstrou maior expressão proteica para NOX1 na bexiga urinária no grupo MNU. Os tratamentos isolados com BCG e Exercício Físico não

foram capazes de diminuir nível proteico. Contudo, a associação entre BCG e Exercício Físico mostrou-se efetiva na diminuição da expressão proteica para NOX1 e, conseqüentemente, podendo influenciar sobre o estresse oxidativo.

Esse importante efeito da combinação terapêutica entre BCG e exercício físico na redução de NOX1 pode ser atribuída ao aumento de Nrf2. Iida et al. (2004) demonstraram que o Nrf2 desempenha uma função importante na detoxicação de agentes cancerígenos derivados metabolicamente a partir de um composto *N-nitroso*, o qual é encontrado no cigarro de tabaco e apontado como um fator relevante envolvido na carcinogênese urotelial. Esses mesmos autores demonstraram que a incidência de CBNMI induzido quimicamente foi mais elevada em camundongos deficientes para Nrf2 quando comparada com camundongos não deficientes para esse fator. Estudos recentes demonstraram que o Nrf2 e vários dos seus genes alvo foram significativamente super-expressos no CBNMI, com aumento de estresse oxidativo e progressão para a doença metastática (Khandrika et al., 2009; Slocum&Kensler, 2011). Assim, o presente estudo demonstrou que a adjuvância do exercício físico à imunoterapia com BCG foi mais efetiva em aumentar a reatividade de Nrf2 em relação aos tratamentos isolados G3 e G4. Portanto, a menor incidência de lesões uroteliais de grau histológico maior poderia ser decorrente da diminuição do nível proteico de NOX1 e aumento do nível proteico de Nrf2, mostrando a ação benéfica da associação entre exercício físico e imunoterapia com BCG. Assim, a análise da atividade de algumas enzimas antioxidantes (Catalase, SOD, Glutathione redutase ou peroxidase, etc) e de indicadores de lesão oxidativa (malondealdeído ou MDA, espécies reativas de ácido tiobarbitúrico ou TBARS ou 8-hidroxi-deoxiguanosina ou 8-OHdG, entre outros) poderiam ajudar a corroborar com a hipótese da redução de estresse oxidativo pela associação BCG/Exercício Físico.

A morte celular por apoptose em vertebrados ocorre, entre outras vias, através da via de apoptose mitocondrial, na qual as proteínas da família Bcl-2 controlam a integridade da

membrana externa da mitocôndria (Llambi & Green, 2011). A apoptose é um evento de morte celular que ocorre tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, e regulado por numerosos mediadores/moduladores, incluindo Bcl-2 e a família das caspases (Kuwana e Newmeyer e 2003; e Brunelle e Letai 2009; Ulukaya et al., 2011). Membros da família Bcl-2 são essenciais nos processos de regulação (por exemplo, Bcl-2 e Bcl-x1) ou indução (por exemplo, Bak, Bax,) da apoptose ou morte celular programada (Kuwana e Newmeyer 2003; Brunelle e Letai 2009; Ulukaya et al, 2011). As caspases são uma família de cisteína proteases que funcionam como reguladores centrais de morte celular (Ulukaya et al., 2011).

Quando as interações entre essas proteínas resultam em apoptose, a proteína efetora Bax altera a membrana mitocondrial num processo chamado de permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP). Se ocorrer a MOMP, proteínas presentes no espaço intermembranar mitocondrial ganham acesso para o citosol e provocam a ativação de caspases que orquestram a morte celular (Llambi & Green, 2011). A função do gene supressor tumoral TP53, o qual é frequentemente mutado em tumores humanos, é de um ativador de apoptose (Degenhardt et al., 2002). O gene TP53 regula a transcrição de genes que impedem o crescimento celular, e ativa a expressão de genes pró-apoptóticos, como a BAX, nas mitocôndrias (Degenhardt et al., 2002). Os resultado do presente estudo demonstraram que a imunoterapia com BCG e BCG + EFA foram efetivos em manter o equilíbrio apoptótico no CBNMI através da aumento dos níveis proteicos de BAX e redução dos níveis de BCL-2. Já no tratamento com MNU+EFA, os níveis proteicos de BCL-2 continuaram elevados em relação ao tratamento com BCG+EFA. Além disso, os níveis de expressão proteica de Akt tem um papel anti-apoptótico (Morimura et al., 2011, Xie et al., 2013), sendo assim, o aumento dos níveis de IGF-1-Akt poderia levar a inibição de apoptose e a progressão tumoral. No presente estudo foi observado maior expressão do nível proteico de Akt na bexiga urinária no grupo MNU e uma redução não seletiva nos demais tratamentos (BCG, EFA e

BCG+EFA). Entretanto, para melhor entendimento do processo de apoptose na carcinogênese urotelial nas vias BCL-2/BAX e IGF-1-AKT e sua indução pelas intervenções BCG e BCG+EFA análises de apoptose e de proliferação celular nas lesões uroteliais são fundamentais e deverão ser realizadas futuramente.

As MMPs também podem direta ou indiretamente afetar a atividade de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Pham et al., 2004; Luo et al., 2005).

As metaloproteinases (MMPs) são uma família de enzimas proteolíticas envolvidas no remodelamento da matriz extracelular, que tem sido observada em tumores com potencial metastático e, além disso, estão relacionadas com a liberação do fator de crescimento fibroblástico (FGF) (Brown et al, 2001), sendo que este estimula a proliferação endotelial, induz alteração na regulação das proteínas responsáveis pela interação célula-célula (Presta et al., 2005) e age de forma sinérgica com VEGF (Cross; Claesson-Welsh, 2001). Outros exemplos de moléculas pró-angiogênicas são a interleucina 8 (IL-8), que está envolvida na regulação de MMP-2 e que atua sobre as células endoteliais (luca et al., 1997) e o fator de crescimento epidermal (EGF), que é uma oncoproteína que regula a atividade de VEGF, IL-8, FGF e MMPs (Mendelsohn, 2002). No presente estudo foi observado aumento da expressão da proteína MMP-2 no grupo MNU enquanto no grupo MNU+BCG+EFA foi observado uma redução dos níveis proteicos de MMP-2, indicando uma atividade protetora vemos que os níveis têm uma redução.

Em resumo, os resultados do presente estudo indicam que os tratamentos com BCG e BCG+Exercício Físico reduziram o desenvolvimento da carcinogênese urotelial, provavelmente decorrente do aumento dos níveis de TLR 2 e 4, estresse oxidativo, angiogênese e potencial aumento de apoptose na bexiga urinária de animais iniciados com a MNU. Assim, o exercício físico aeróbio pode aumentar a eficácia do BCG no tratamento do CBNMI.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

American Cancer Society. Bladder Cancer Overview. In: How Many People Get Bladder Cancer? American Cancer Society, Atlanta. Disponível Em: [http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI\\_2\\_2\\_1X\\_How\\_Many\\_People\\_Get\\_Bladder\\_Cancer\\_44.asp?Sitearea](http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_2_1X_How_Many_People_Get_Bladder_Cancer_44.asp?Sitearea). Acesso Em 16 Dez, 2013.

Abdollahi A, Lipson Ke, Sckell A, Zieher H, Klenke F, Poerschke D, Roth A, Han X, Krix M, Bischof M, Hahnfeldt P, Grone Hj, Debus J, Hlatky L, Huber Pe. Combined Therapy With Direct And Indirect Angiogenesis Inhibition Results In Enhanced Antiangiogenic And Antitumor Effects. *Cancer Res.* V.63, P.8890-8898, 2003.

Aguiar E Silva MA, Vechetti-Junior IJ, Nascimento AF, Furtado KS, Azevedo L, Ribeiro DA, Barbisan LF. Effects Of Swim Training On Liver Carcinogenesis In Male Wistar Rats Fed A Low-Fat Or High-Fat Diet. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2012 Dec;37(6):1101-9. Doi: 10.1139/H2012-129. Epub 2012 Sep 10.

Akira, S.; Takeda, K. Toll-Like Receptor Signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, V.4, P.499-511, 2004.

Allavena, P.; Garlanda, C.; Borrello, M.G.; Sica, A.; Mantovani, A. Pathways Connecting Inflammation And Cancer. *Curr Opin Genet Dev.*; V. 18, Pp.3-10, 2008.

American Cancer Society. Overview: Bladder Cancer. In: How Many People Get Bladder Cancer? American Cancer Society, Atlanta. Disponível Em: [http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI\\_2\\_2\\_1X\\_How\\_Many\\_People\\_Get\\_Bladder\\_Cancer\\_44.asp?Sitearea](http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_2_1X_How_Many_People_Get_Bladder_Cancer_44.asp?Sitearea). Acesso Em 11/02/2011.

Andreas Bo, Brandau S. Immune Mechanisms In Bacillus Calmette Guerin Immunotherapy For Superficial Bladder Cancer. *J Urol.* V.170, P.964-969, 2003.

Askeland, E.J.; Newton, M.R.; O'donnell, M.A.; Luo, Y. Bladder Cancer Immunotherapy: Bcg And Beyond. *Adv Urol.*; V.2012, Pp.181987, 2012.

Ayari, C.; Bergeron, A.; Larue, H.; Ménard, C.; Fradet, Y. Toll-Like Receptors In Normal And Malignant Human Bladders. *J Urol.* V.185, N. 5, Pp. 1915-21, 2011.

Badjatia N, Satyam A, Singh P, Et Al. Altered Antioxidant Status And Lipid Peroxidation In Indian Patients With Urothelial Bladder Carcinoma. *Urol Oncol.* V.28, P.360-367, 2010.

Bayraktar N, Kilic S, Bayraktar Mr, Et Al. Lipid Peroxidation And Antioxidant Enzyme Activities In Cancerous Bladder Tissue And Their Relation With Bacterial Infection: A Controlled Clinical Study. *J Clin Lab Anal.* V.24, P. 25-30, 2010.

Bem-Baruch, A. The Multifaceted Roles Of Chemokines In Malignancy. *Cancer Metastasis Rev.* V.25(3), Pp.357-371, 2006.

Bergasa, N.V., Mehlman, J., Bir, K. Aerobic Exercise: A Potencial Therapeutic Intervention For Patients With Liver Disease. *Medical Hypotheses.* 2004; (62): 935-941.

Bohle, A.; Brandau, S. Imune Mechanisms In Bacillus Calmette Guerin Immunotherapy For Superficial Bladder Cancer. *J Urol.*; V.170, Pp.964–969, 2003.

Botteman, M.F.; Pashos, C.L.; Redaelli, A.; Laskin, B.; Hauser, R. The Health Economics Of Bladder Cancer: A Comprehensive Review Of The Published Literature. *Pharmacoeconomics*. V. 21, N.18, Pp. 1315-30, 2003.

Brown Ns, Bicknell R. Hypoxia And Oxidative Stress In Breast Cancer: Oxidative Stress, Its Effects On The Growth, Metastatic Potential, And Response To Therapy Of Breast Cancer. *Breast Cancer Res*. V.3, P.323–327, 2001.

Brown, G.D.; Herre, J.; Williams, D.L.; Willment, J.A.; Marshall, A.S.; Gordon, S. Dectin-1 Mediates The Biological Effects Of Beta-Glucans. *J Exp Med.*; V.197, P.1119-24, 2003.

Brown-Borg Hm, Bode Am, Bartke A. Antioxidative Mechanisms And Plasma Growth Hormone Levels: Potencial Relationship In The Aging Process. *Endocrine*. V.11, P. 41-8, 1999.

Brum Pc, Forjaz Cl, Tinucci T, Negrão Ce. Adaptações Agudas E Crônicas Do Exercício Físico No Sistema Cardiovascular. *Rev Paul Educ Fís*. V.18, P.21-31, 2004.

Brunelle JK, Letai A. Control Of Mitochondrial Apoptosis By The Bcl-2 Family. *J Cell Sci*. 2009 Feb 15;122(Pt 4):437-41. Doi: 10.1242/Jcs.031682. Review

Cohen Sm. Comparative Pathology Of Proliferative Lesions Of The Urinary Bladder. *Toxicol Pathol*. V.30, P.663–671, 2002.

Colditz Ga, Cannuscio Cc, Frazier Al. Physical Activity And Reduced Risk Of Colon Cancer: Implications For Prevention. *Cancer Causes Control*. V8(4), P.649-667, 1997.

Courneya, K.S. Exercise Interventions During Cancer Treatment Biopsychocial Outcomes. *Exerc. Sport. Sci. Rev*. 2001; 29(2): 60-64.

Crallan Ra, Georgopoulos Nt, Sothgate J. Experimental Models Of Human Bladder Carcinogenesis. *Carcinogenesis*. V.27, P.374–381, 2006.

Cramp, F., James, A., Lambert, J. The Effects Of Resistance Training On Quality Of Life In Cancer: A Systematic Literature Review And Meta-Analysis. *Support Care Cancer*. 2010; 18:1367-1376.

Cross, M.J.; Claesson-Welsh, L. Fgf And Vegf Function In Angiogenesis: Signaling Pathways, Biological Responses And Therapeutic Inhibition. *Trends Pharmacol. Sci.*, V.22, P.201-207, 2001.

Chodak GW, Hospelhorn V, Judge SM, Mayforth R, Koeppen H, Sasse J. Increased Levels Of Fibroblast Growth Factor-Like Activity In Urine From Patients With Bladder Or Kidney Cancer. *Cancer Res*. 1988 Apr 15;48(8):2083-8.



Degenhardt, K.; Chen, G.; Lindsten, T.; White, E. Bax And Bak Mediate P53-Independent Suppression Of Tumorigenesis. *Cancer Cell.*; V.2, Pp.193-203, 2002.

Dolcet, X.; Llobet, D.; Pallares, J.; Matias-Guiu, X. Nf-Kb In Development And Progression Of Human Cancer. *Virchows Arch.*; V.446, Pp.475-482, 2005.

Ducan K, Harris S, Ardies Cm. Running May Reduce Risk For Lung And Liver Cancer By Inducing Activity Of Antioxidant And Phase Ii Enzymes. *Cancer Lett.* V.116(2):151-8,1997.

Eblin Ke, Hau Am, Jensen Tj, Et Al. The Role Of Reactive Oxygen Species In Arsenite And Monomethylarsonous Acid-Induced Signal Transduction In Human Bladder Cells: Acute Studies. *Toxicology.* V.250, P.47-54, 2008.

Elsbach P, Weiss P. A Revaluation Of The Roles Of O<sub>2</sub>- Dependent And O<sub>2</sub>- Independent Microbicidal Systems Of Phagocytes. *Rev Infect Dis.* V.5, P.843-53, 1983.

Epstein JI, Amin Mb, Reuter Vr. The World Health Organization / International Society Of Urological Pathology Consensus Classification Of Urothelial (Tranticional Cell) Neoplasms Of The Urinary Bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol.* V.22, P. 1435-48, 1998.

Evans, W.J. Exercise Training Guidelines For The Elderly. *Med Sci Sports Exerc.* 1999; 31:12-7.

Fajkovic H, Halpern JA, Cha EK, Et Al. Impact Of Gender On Bladder Cancer Incidence, Staging, And Prognosis. *World J Urol .* V29, P457-463,2011.

Fávaro, W.J.; Nunes, O.S.; Seiva, F.R.; Nunes, I.S.; Woolhiser, L.K.; Durán, N.; Lenaerts, A.J. Effects Of P-Mapa Immunomodulator On Toll-Like Receptors And P53: Potential Therapeutic Strategies For Infectious Diseases And Cancer. *Infect Agent Cancer.*; V.7, P.14, 2012.

Fong G.H, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role Of The Flt-1 Receptor Tyrosine Kinase In Regulating The Assembly Of Vascular Endothelium. *Nature.* 1995 Jul 6;376(6535):66-70.

Folkman J. Antiangiogenesis In Cancer Therapy--Endostatin And Its Mechanisms Of Action. *Exp. Cell. Res.*; V.312, P.594-607, 2006.

Folkman, J.; Hahnfeltd, P.; Hlatky, L. The Logic Of Anti-Angiogenic Gene Therapy Friedmann T. Eds. *The Development Of Gene Therapy*, 1-17, Cold Spring Harbor Laboratory Press New York, 1998.

Friedenreich Cm. Courneya, K.S E Bryant, H.E. Relation Between Intensity Of Physical Activity And Breast Cancer Risk Reduction. *Med. Sc. Sports Exercise.* V.33:1538-1545, 2001.

Fukushima S, Friedell G.H, Jacobs J.B. Effect Of L-Tryptophan And Sodium Saccharin On Urinary Tract Carcinogenesis Initiated By N-[4-(5-Nitro-2-Furyl)-2-Thiazolyl] Formamide. *Cancer Res.* V.41, P.3100-3103, 1981.

Gakis G, Stenzl A. Gender-Specific Differences In Muscle-Invasive Bladder Cancer: The Concept Of Sex Steroid Sensitivity. *World J Urol* 2013; 31:1059- 1064.

Galli, R.; Starace, D.; Busà, R.; Angelini, D.F.; Paone, A.; De Cesaris, P.; Filippini, A.; Sette, C.; Battistini, L.; Ziparo, E.; Riccioli, A. Tlr Stimulation Of Prostate Tumor Cells Induces Chemokine-Mediated Recruitment Of Specific Immune Cell Types. *J Immunol.*; V.184, Pp.6658-6669, 2010.

Garcia, P.V.; Apolinario, L.M.; Bockelmann, P.K.; Nunes, I.S.; Durán, N.; Fávoro, W.J.: Alterations In Ubiquitin Ligase Siah-2 And Its Corepressor N-Cor After P-Mapa Immunotherapy And Anti-Androgen Therapy: New Therapeutic Opportunities For Non-Muscle Invasive Bladder Cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(5): 4427-4443, 2015.

Gianni, L., Dombernowsky, P., Sledge, G. Cardiac Function Following Combination Therapy With Paclitaxel And Doxorubicin: An Analysis Of 6.57 Women With Advanced Breast Cancer. *Ann Oncol.* 2001; 12:1067-1073.

Gopalakrishna A, Longo TA1, Fantony JJ, Van Noord M, Inman BA. Lifestyle Factors And Health-Related Quality Of Life In Bladder Cancer Survivors: A Systematic Review. *J Cancer Surviv.* 2016 Mar 21. [Epub Ahead Of Print]

Grimmer G, Dettbarn G, Seidel A. Detection Of Carcinogenic Aromatic Amines In The Urine Of Non-Smokers. *Sci Total Environ.* V.247, P.81-90, 2000.

Hall, M.C.; Chang, S.S.; Dalbagni, G.; Pruthi, R.S.; Seigne, J.D.; Skinner, E.C.; Wolf, J.S. Jr.; Schellhammer, P.F.: Guideline For The Management Of Non Muscle Invasive Bladder Cancer (Stages Ta, T1, And Tis): 2007 Update. *J Urol.*; V.178, Pp.2314-2330, 2007.

Harris AL. Hypoxia--A Key Regulatory Factor In Tumour Growth. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jan;2(1):38-47. Review.

Henning, A, Wehrberger M, Madersbacher S, Et Al. Do Differences In Clinical Symptoms And Referral Patterns Contribute To The Gender Gap In Bladder Cancer? *BJU Int* 2013; 112:68-73.

Hicks Rm, Wakefield Js. Rapid Induction Of Bladder Cancer In Rats With N-Methyl-N-Nitrosourea. I. Histology. *Chem. Biol. Interact.* V.5, P.139-152, 1972.

Howlander, N.; Et Al. *Seer Cancer Statistics Review, 1975-2010*, National Cancer Institute. Bethesda. Disponível Em: [Http://Seer.Cancer.Gov/Csr/1975\\_2007/](http://Seer.Cancer.Gov/Csr/1975_2007/). Acesso Em: 18 Dez, 2013.

Horton Tj, Hill J. Exercise And Obesity. *Proceed Society Nutr.* V.57, P.85-91, 1990.

[Http://Www2.Inca.Gov.Br/Wps/Wcm/Connect/Tiposdecancer/Site/Home/Bexiga.\(Inca-Brasil-2015\).](http://Www2.Inca.Gov.Br/Wps/Wcm/Connect/Tiposdecancer/Site/Home/Bexiga.(Inca-Brasil-2015).)

Huang, B.; Zhao, J.; Shen, S.; Li, H.; He, K.L.; Shen, G.X.; Mayer, L.; Unkeless, J.; Li, D.; Yuan, Y.; Zhang, G.M.; Xiong, H.; Feng, Z.H. *Listeria Monocytogenes Promotes Tumor Growth Via Tumor Cell Toll-Like Receptor 2 Signaling*. *Cancer Res.*; V.67, Pp.4346–4352, 2007.

Ichimura Y, Habuchi T, Tsuchiya N, Et Al. Increased Risk Of Bladder Cancer Associated With A Glutathione Peroxidase 1 Codon 198 Variant. *J Urol*. V.172, P.728-32, 2004.

Iida, K.; Itoh, K.; Kumagai, Y. Nrf2 Is Essential For The Chemopreventive Efficacy Of Oltipraz Against Urinary Bladder Carcinogenesis. *Cancer Res.*; V.64, Pp.6424–6431, 2004.  
Iatropoulos MJ, Williams GM. Proliferation Markers. *Exp Toxicol Pathol*. 1996 Feb;48(2-3):175-81. Review.

Jacobs AC, Hatfield KP. History Of Chronic Toxicity And Animal Carcinogenicity Studies For Pharmaceuticals. *Vet Pathol*. 2013 Mar;50(2):324-33. Doi: 10.1177/0300985812450727. Epub 2012 Jun 13. Review.

Johnson, E.K, Daignault S, Zhang Y, Lee CT. Patterns Of Hematuria Referral To Urologists: Does A Gender Disparity Exist? *Urology* 2008; 72:498–502.

Jones, L.W., Peppercorn, J., Scoot, Battaglini, C. Erratum To: Exercise /Therapy In The Management Of Solid Tumors. *Current Treatment Options In Oncology*. P11: 73-86. 2010;

Kalter J, Kampshoff CS, Chinapaw MJ, Van Mechelen W, Galindo-Garre F, Schep G, Verdonck-De Leeuw IM, Brug J, Buffart LM. Mediators Of Exercise Effects On Hrql In Cancer Survivors After Chemotherapy. *Med Sci Sports Exerc*. 2016 Apr 29. [Epub Ahead Of Print]

Kemp, T.J.; Ludwig, A.T.; Earel, J.K.; Moore, J.M.; Vanoosten, R.L.; Moses, B.; Leidal, K.; Nauseef, W.M.; Griffith, T.S. Neutrophil Stimulation With Mycobacterium Bovis Bacillus Calmette-Guerin (Bcg) Results In The Release Of Functional Soluble Trail/Apo-2l. *Blood.*; V.106, Pp.3474-3482, 2005.

Kerigh, F.B., Bahrami, A., Shamsa, A., Abolbashari, M. Assessment Of Angiogenic Factor, Vascular Endothelial Growth Factor, Serum And Urine Level Changes In Superficial Bladder Tumor Immunotherapy By Intravesical Bacillus Calmette-Guerin. *Urol Ann*. Sep-Dec; 2(3): 91–95] .2010

Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul Hk. Oxidative Stress In Prostate Cancer. *Cancer Lett.*, V.282, P.125-136, 2009.

Kimbrow KS, Simons JW. Hypoxia-Inducible Factor-1 In Human Breast And Prostate Cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2006 Sep;13(3):739-49

Kirkali, Z.; Chan, T.; Manoharan, M.; Algaba, F.; Busch, C.; Cheng, L.; Kiemeny, L.; Kriegmair, M.; Montironi, R.; Murphy, W.M.; Sesterhenn, I.A.; Tachibana, M.; Weider, J. Bladder Cancer: Epidemiology, Staging And Grading, And Diagnosis. *Urology*, V. 66, N.6, Suppl 1, Pp.4-34, 2005.

Kong Q, Beel Ja, Lillehei Ko. A Threshold Concept For Cancer Therapy. *Med Hypotheses*. V.55, P 29–35, 2000.

Krieg, A.M. Development Of Tlr9 Agonists For Cancer Therapy. *J. Clin. Invest.*; V.117, Pp.1184–1194, 2007.

Kerigh, B.F, Bahrami A, Shamsa A, Abolbashari M. Assessment Of Angiogenic Factor, Vascular Endothelial Growth Factor, Serum And Urine Level Changes In Superficial Bladder Tumor Immunotherapy By Intravesical Bacillus Calmette-Guerin. *Urol Ann*. 2010 Sep;2(3):91-5. Doi: 10.4103/0974-7796.68855.

Kroft Sh, Oyasu R. Urinary Bladder Cancer: Mechanisms Of Development And Progression. *Lab Invest*. V.71, P.158–174, 1994.

Kroft, S.H.; Oyasu. R. Urinary Bladder Cancer: Mechanisms Of Development And Progression. *Lab Invest.*; V.71, Pp.158–174, 1994.

Kumar, H.; Kawai, T.; Akira, S. Pathogen Recognition By The Innate Immune System. *Int. Rev. Immunol.*, V.30, P.16-34, 2011.

Kuo, H.K, Yen C.J, Chen J.H. Association Of Cardiorespiratory Fitness And Levels Of C-Reactive Protein: Data From The National Health And Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Am. J. Cardiology.*, V. 114: 28-33, 2007.

Kuwana, T, Newmeyer D.D. Bcl-2-Family Proteins And The Role Of Mitochondria In Apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Dec;15(6):691-9.

Lamm, D.L.; Stogdill, V.D.; Stogdill, B.J.; Crispen, R.G.: Complications Of Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy In 1,278 Patients With Bladder Cancer. *J Urol.*; V.135, Pp.272-274, 1986.

Larue, H.; Ayari, C.; Bergeron, A.; Fradet, Y. Toll-Like Receptors In Urothelial Cells--Targets For Cancer Immunotherapy. *Nat Rev Urol*. V. 10, N. 9, Pp. 537-45, 2013.

Llambi, F.; Green, D.R. Apoptosis And Oncogenesis: Give And Take In The Bcl-2 Family. *Curr Opin Genet Dev.*; V.21, Pp.12-20, 2011.

Leyk, D. The Preventive And Therapeutic Roles Os Regular Physical Activity. . *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106(44): 713-4.

Luca, M.; Et Al. Expression Of Interleukin-8 By Human Melanoma Cells Up-Regulates Mmp-2 Activity And Increases Tumor Growth And Metastasis. *Am. J. Pathol.*, V.151, P.1105-1113, 1997.

Lunz W, Peluzio Cmgc, Dias Apb, Moreira And Natali Aj. Long-Term Aerobic Swimming Training By Rats Reduces The Number Of Aberrant Crypt Foci In 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Colon Cancer. *Braz J Med Biol Res*. V.41(11) P.1000-1004, 2008.

Luo, J.L.; Kamata, H.; Karin, M. Ikk/Nf-Kappab Signaling: Balancing Life And Death – A New Approach To Cancer Therapy. *J Clin Invest.*; V.115, P. 2625–2632, 2005.

Macvicar, M.G., Winningham, M. L., Nickel, J. L. Effects Of Aerobic Interval Training On Cancer Patients Functional Capacity. *Nurs Res.*; 38:348-351.1989.

Matijevic, T.; Pavelic, J. Toll-Like Receptors: Cost Or Benefit For Cancer? *Curr Pharm Des.*; V.16, Pp.1081-1090, 2010.

Malicka I, Siewierska K, Pula B, Kobierzycki C, Haus D, Paslawska U, Cegielski M, Dziegiel P, Podhorska-Okolow M And Wozniewski M. The Effect Of Physical Training On The N-Methyl-N-Nitrosourea-induced Mammary Carcinogenesis Of Sprague–Dawley Rats. *Exp Biol Med* (Maywood) Onlinefirst, Published On May 19, 2015 As Doi:10.1177/1535370215587532

Manchado Fb, Gobatto Ca, Contarteze Rvl, Patoti M, Mello Mar Mcneely. Máxima Fase Estável De Lactato É Ergômetro-Dependente Em Modelo Experimental Utilizando Ratos. *Rev Bras Méd Esporte.* V.12, N5 P 259-262. 2006.

Mantovani, A.; Allavena, P.; Sica, A.; Balkwill, F. Cancer-Related Inflammation. *Nature.*; V. 454, Pp.436-44, 2008.

Matthew, S. W., Emily, M. S. Cancer Prevention, Aerobic Capacity, And Physical Functioning In Survivors Related To Physical Activity: A Recent Review. *Cancer Management And Research.* 2010; 2:157-164.

MENDELSON, J. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J. Clin. Oncol.*, v.20, p.1-13, 2002.

Mizui T, Ishimaru J, Miyamoto K, Kurita K. Matrix Metalloproteinase-2 In Synovial Lavage Fluid Of Patients With Disorders Of The Temporomandibular Joint. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2001 Aug;39(4):310-4.

Miyamoto K, Ishimaru J, Kurita K, Goss AN. Synovial Matrix Metalloproteinase-2 In Different Stages Of Sheep Temporomandibular Joint Osteoarthritis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002 Jan;60(1):66-72.

Mcneely, M.L., Campell, K.L., Rowe, B., Klassen, T.P., Mackey, J. R., Courneya, K. S. Effects Of Exercise On Breast Cancer Patients And Survivors: A Systematic Review And Meta-Analysis. *CMAJ.* 2006; 175: 34-41.

Mctiernan, A. Mechanisms Linking Physical Activity With Cancer. *Nature.* 2008. P205-2011  
Messer JC, Shariat SF, Dinney CP, Et Al. Female Gender Is Associated With A Worse Survival After Radical Cystectomy For Urothelial Carcinoma Of The Bladder: A Competing Risk Analysis. *Urology* 2014; 83:863–867. This Is A Large Multicentre Study Including More Than 4000 Patients With UCB Undergoing Radical Cystectomy. In A Multivariate Regression Model Adjusted For Competing Risk And Other Factors, Women Demonstrated A 25% Higher CSM Than Male Patients (P=0.002).

Montironi, R.; Lopez-Beltran, A. The 2004 WHO Classification Of Bladder Tumors: A Summary And Commentary. *Int J Surg Pathol.*; V.13, Pp.143-153, 2005.

- Morales, A.; Eidinger, D. Bacillus Calmette-Guerin In The Treatment Of Adenocarcinoma Of The Kidney. *J. Urol.*, V.115, P.377-380, 1976.
- Na, H.K., Oliynyk, S. Effects Of Physical Activity On Cancer Prevention. *Nutrition And Physical Activity In Aging, Obesity, And Cancer.*: 176-183. 2011.
- Nieman, D.C. Exercise Immunology: Partical Applications. *Int J Sports Med.* 18 Suppl.1) S91-100. 1997
- Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, Richie JP, Hayes DF, Folkman J. Elevated Levels Of An Angiogenic Peptide, Basic Fibroblast Growth Factor, In The Urine Of Patients With A Wide Spectrum Of Cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1994 Mar 2;86(5):356-61.
- O'reilly M.S, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane Ws. Endostatin: An Endogenous Inhibitor Of Angiogenesis And Tumour Growth. *Cell.* V.88, P.277–285, 1997.
- Oliveira P.A, Colaco A, De La Cruz Plf. Experimental Bladder Carcinogenesis-Rodent Models. *Exp Oncol.* V.28, 2–11, 2006.
- Oyasu, R.: Epithelial Tumours Of The Lower Urinary Tract In Humans And Rodents. *Food Chemtoxicol.*: V. 33, Pp.747-55, 1995.
- Packer L, Cadenas E, Davies Kj. Free Radicals And Exercise: An Introduction. *Free Radic Biol Med.* V.44(2):123-5 Epub, 2007.
- Paffenbarger, Jr.R.S., Hyde, R.T., Wing, A.L., Lee, I.M., Jung, D.L., Kampert, J.B. The Association Of Changes In Physical-Activity Level And Other Lifestyle Characteristics With Mortality Among Men. *N Engl. J. Med.* 1993; 328(8):538-45.
- Paone, A.; Starace, D.; Galli, R.; Padula, F.; De, C.P.; Filippini, A.; Ziparo, E.; Riccioli, A. Toll-Like Receptor 3 Triggers Apoptosis Of Human Prostate Cancer Cells Through A Pkc-A–Dependent Mechanism. *Carcinogenesis*; V.29, P.1334–1342, 2008.
- Parkin D.M. The Global Burden Of Urinary Bladder Cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2008; 12–20.
- Parks W.C, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix Metalloproteinases As Modulators Of Inflammation And Innate Immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004 Aug;4(8):617-29. Review.
- Pham, C.G.; Bubici, C.; Zazzeroni, F. Ferritin Heavy Chain Upregulation By Nf-Kappab Inhibits Tnfalpha-Induced Apoptosis By Suppressing Reactive Oxygen Species. *Cell*; V.119, P.529–542, 2004.
- Perabo F.G, Willert Pl, Wirger A, Et Al. Superantigen-Activated Mononuclear Cells Induce Apoptosis In Transitional Cell Carcinoma. *Anticancer Res.*, V.25, P.3565-73, 2005.
- Presta, M.; et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, v.16, p.159-178, 2005.

Rakoff-Nahoum, S.; Medzhitov, R. Toll-Like Receptors And Cancer. *Nat. Rev. Cancer*; V.9, Pp.57–63, 2009.

Reis Lo, Pereira Tc, Favaro Wj, Et Al. Experimental Animal Model And Rna Interference: A Promising Association For Bladder Cancer Research. *World J Urol.*, V.27, P.353-361, 2009.

Ro, J. Y.; Staerckel, G. A.; Ayala, A. G.: Cytologic And Histologic Features Of Superficial Bladdercancer. *Urolclin North Am.*; V.19, Pp. 435–453, 1992.

Schamhart Dh, Boer Ec, Reijke Tm, Et Al. Urinary Cytokines Reflecting The Immunological Response In The Urinary Bladder To Biological Response Modifiers: Their Practical Use. *Eur Urol.*,V.37, P.16, 2000.

Schmidt A, Sommer F, Ozgür E, Klotz T, Engelmann U, Addicks K, Bloch W. Vessels In Benign Prostatic Hyperplasia Contain More Binding Sites For Endostatin Than Vessels In Normal Prostate Tissue. *Eur Urol.* V.46, P.765-767, 2004.

Schmitz, K.H., Holtzaman, J., Cournya, K.S., Mâ S Se L.C., Duval, S., Kane, R. Controlled Physical Activity Trials In Cancer Survivors: A Systematic Review And Meta-Analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14:1588-95.

Schoenberg, M.H., Halle, M. Physical Activity In The Prevention And Treatment Of Colorectal Carcinoma. *Dtsch Arztebl Int*; 106(44): 722-7. 2009

Schultzel, M.; Saltzstein, S.L.; Downs, T.M.; Shimasaki, S.; Sanders, C.; Sadler, G.R. Late Age (85 Years Or Older) Peak Incidence Of Bladder Cancer. *J. Urol.* Vol. 179, N.4, Pp. 1302-5, 2008.

Salaun, B.; Lebecque, S.; Matikainen, S.; Rimoldi, D.; Romero, P. Toll Like Receptor 3 Expressed By Melanoma Cells As A Target For Therapy? *Clin Cancer Res.*; V.13, Pp.4565–4574, 2007.

Segal, A.W.; Shatwell, K.P. The NADPH Oxidase Of Phagocytic Leukocytes. *Ann N Y Acad Sci.*; V.832, Pp.215-222, 1997.

Semenza G.L. Targeting HIF-1 For Cancer Therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003 Oct;3(10):721-32. Review.

Shariat S.F, Sfakianos JP, Droller MJ, Et Al. The Effect Of Age And Gender On Bladder Cancer: A Critical Review Of The Literature. *BJU Int* 2010; 105:300– 308.

Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal Transduction By Vegf Receptors In Regulation Of Angiogenesis And Lymphangiogenesis. *Exp Cell Res.* V.312, P.549–560, 2006.

Shimada, K.; Fujii, T.; Anai, S.; Fujimoto, K.; Konishi, N. ROS Generation Via Nox4 And Its Utility In The Cytological Diagnosis Of Urothelial Carcinoma Of The Urinary Bladder. *Bmc Urol.*; V.11, Pp.22, 2011.

Shimada, K.; Nakamura, M.; Anai, S. A Novel Human Alkb Homologue, Alkbh8, Contributes To Human Bladder Cancer Progression. *Cancer Res.*; V.69, Pp.3157-3164, 2009.

Sievert, K.D.; Amend, B.; Nagele, U.; Schilling, D.; Bedke, J.; Horstmann, M.; Hennenlotter, J.; Kruck, S.; Stenzl, A. Economic Aspects Of Bladder Cancer: What Are The Benefits And Costs? *World J. Urol.*, V. 27, N. 3, Pp. 295-300, 2009.

Slocum, S.L.; Kensler, T.W. Nrf2: Control Of Sensitivity To Carcinogens. *Arch Toxicol.*; V.85, Pp.273-284, 2011.

Srikrishna, G.; Freeze, H.H. Endogenous Damage-Associated Molecular Pattern Molecules At The Crossroads Of Inflammation And Cancer. *Neoplasia.*; V.11, Pp.615-28, 2009.

Steinberg Gd, Brendler Cb, Ichikawa T Et Al. Characterization Of An N-Methyl-N-Nitrosurea Induced Autochthonous Rat Bladder Cancer Model. *Cancer Res.*, V.50, P.6668-6741, 1990.

Stopiglia, R.M., Matheus, W.E., Garcia, P.V., Billis A., Castilho, M.T., Figueiredo De Jesus, V.H., Ferreira, U., Fávoro, W.J. Molecular Assessment Of Non-Muscle Invasive And Muscle Invasive Bladder Tumors: Mapping Of Putative Urothelial Stem Cells And Toll-Like Receptors (Tlr)Signaling .*Journal Of Cancer Therapy*, , 6, 129-140.2015

Sylvester, R.J.; Van Der Meijden, A.P.; Lamm, D.L.: Intravesical Bacillus Calmette-Guerin Reduces The Risk Of Progression In Patients With Superficial Bladder Cancer: A Meta-Analysis Of The Published Results Of Randomized Clinical Trials. *J Urol.*; V.168, Pp.1964-1970, 2002.

Taylor CT, Pouyssegur Joxygen, Hypoxia, And Stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Oct;1113:87-94. Epub 2007 May 4.

Takeda, K.; Akira, S. Tlr Signaling Pathways. *Semin Immunol.*; V.16, Pp.3-9, 2004.

Takeda, K.; Kaisho, T.; Akira, S. Toll-Like Receptors. *Annu Rev Immunol.*: V.21, Pp. 335-76, 2003.

Tuygun C, Kankaya D, Imamoglu A, Et Al. Sex-Specific Hormone Receptors In Urothelial Carcinomas Of The Human Urinary Bladder: A Comparative Analysis Of Clinicopathological Features And Survival Outcomes According To Receptor Expression. *Urol Oncol* 2011; 29:43–51.

Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y. Apoptosis: Why And How Does It Occur In Biology? *Cell Biochem Funct.* 2011 Aug;29(6):468-80. Doi: 10.1002/Cbf.1774. Epub 2011 Jul 19

Ushio-Fukai M, Nakamura Y. Reactive Oxygen Species And Angiogenesis: Nadph Oxidase As Target For Cancer Therapy. *Cancer Lett.* V.266,P.37–52, 2008.

van Ginkel S, Ruoss S, Valdivieso P, Degens H, Waldron S, de Haan A, Flück M. ACE inhibition modifies exercise-induced pro-angiogenic and mitochondrial gene transcript expression.*Scand J Med Sci Sports.* 2015 Sep 26. doi: 10.1111/sms.12572.



Vieira, V.J., Valentine, R.J., Wilund, K.R., Antao, N., Baynard, T., Woods, J.A. Effects Of Exercise And Low-Fat Diet On Adipose Tissue Inflammation And Metabolic Complications Obese Mice. *Am. J. Physiol Endocrinol Metab*; 2009; 296: E1164–E1171.

Wermore, C.M., Ulrich, C.M. In *Cancer Prevention And Management Through Exercise And Weight Control*. Mc Tiernan A.. 157-175. 2006

Williams, P.D, Lee Jk, Theodorescu D. Molecular Credentialing Of Rodent Bladder Carcinogenesis Models. *Neoplasia*, V.10, P.838–846, 2008.

Winningham, M.,L., Macvicar, M.G. The Effect Of Aerobic Exercise On Patient Reports Of Nausea. *Oncol Nurs Forum.*; 15:447-450. 1989

Winningham, M.L. Walking Program For People With Cancer, *Getting Started Cancer Nurs.*; 14:270-276. 1991

Winningham, M.L., Macvicar, M.G., Bondoc M. Effect Of Aerobic Exercise On Body Weight And Composition In Patients With Breast Cancer On Adjuvant Chemotherapy. *Oncol Nurs Forum.*; 16:683-689. 1989

Wolff I, Brookman-May S, May M. Sex Difference In Presentation And Outcomes Of Bladder Cancer: Biological Reality Or Statistical Fluke?. *Curr Opin Urol*. 2015 Sep;25(5):418-26. Doi: 10.1097/MOU.000000000000198. Review.

World Health Organization. Policies And Managerial Guidelines For National Cancer Control Programs. *Rev Panam Salud Publica*. V 12 P366-370, 2002.

Xu Y, Zhang NZ, Chen J, Yuan HQ. Biomarkers In Urothelial Carcinoma Of The Bladder: The Potential Cross-Talk Between Transforming Growth Factor-B1 And Estrogen Receptor B/Androgen Receptor Pathways. *Med Hypotheses* 2013; 80:716–718.

Yoshida K, Takatsuka S, Hatada E, Nakamura H, Tanaka A, Ueki K, Nakagawa K, Okada Y, Yamamoto E, Fukuda R Expression Of Matrix Metalloproteinases And Aggrecanase In The Synovial Fluids Of Patients With Symptomatic Temporomandibular Disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Jul;102(1):22-7. Epub 2006 May 11.

Zeegers, M.P, Tan Fe, Dorant E. The Impact Of Characteristics Of Cigarette Smoking On Urinary Tract Cancer Risk: A Meta-Analysis Of Epidemiologic Studies. *Cancer*, V.89, P.630–639, 2000.

Zhang ,Y.; Zhu, C.; Curado, M.P.; Zheng, T.; Boyle, P. Changing Patterns Of Bladder Cancer In The Usa: Evidence Of Heterogeneous Disease. *Bju Int.*; V.109; Pp.52-56, 2011.